

OCORRÊNCIA DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM
ÁGUAS NÃO TRATADAS DESTINADAS A
CONSUMO HUMANO

Por

Diana de Almeida Carmona Fernandes

Lisboa

2008

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica de Vanessa Ranhada Pinto Jorge Pereira, Investigadora, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET) sito no Instituto de Tecnologia Experimental e Tecnológica da Universidade Nova de Lisboa (ITQB-UNL), Oeiras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Dr.^a Vanessa Pereira, a minha orientadora, por me ter dado a oportunidade de realizar este trabalho e fazer parte de um projecto que ela tanto acarinha; pelo acompanhamento de todos os dias; por me chamar à realidade sempre que eu me perdia com ideias e ideias e ideias; pelas reuniões no café (sim, é verdade); mas, principalmente, pela amizade com que sempre me presenteou.

À Dr.^a Teresa Crespo agradeço por me ter aberto as portas do seu laboratório, permitindo-me a realização deste trabalho e a aprendizagem de novas técnicas e metodologias de trabalho. Agradeço ainda pela disponibilidade e também pela boa disposição e carinho com que sempre me tratou.

À Dr.^a Vitória San Romão, obrigada pelos ensinamentos e pelas “dicas” para passar à etapa seguinte quando me perdia no “maravilhoso mundo dos fungos”.

À Dr.^a Gilda Carvalho agradeço a paciência para me explicar tudo sobre o universo incerto do DGGE.

À Carmo Basílio por me ajudar a descobrir cada vez mais sobre os fungos.

Ao Michel Domingues pela partilha do trabalho no laboratório e pela ajuda na análise dos primeiros resultados.

A todas as pessoas com quem partilhei o laboratório durante este ano: à Paula, à Filipa, à Catarina, à Sandra, à Bárbara e ao DouDou, muito obrigada por me fazerem ter vontade de sair de casa todos os dias e ir para o laboratório.

Aos meus amigos pelo apoio incondicional, independentemente da minha (falta de) disponibilidade para partilhar com eles todos os momentos.

Aos meus Pais, a quem agradeço não só por este ano, mas por sempre, por serem simplesmente fantásticos. Obrigada!

Ao Leonardo, por compreender sempre que eu ficava a trabalhar até mais tarde e lhe dizia “hoje não vamos às aulas de dança” ou quando abusava e dizia mesmo “esta semana...”, pelos conselhos sempre sensatos, por ser um calmante natural mas, acima de tudo, por dizer o quanto me ama todos os dias. Obrigado Amor!

SUMÁRIO

Apesar da sua vasta ocorrência, tem sido prestada pouca atenção à presença de fungos em ambientes aquáticos. São, portanto, necessários mais estudos nesta área uma vez que os fungos aquáticos poderão estar associados a várias doenças, problemas com o sabor e o cheiro e contaminação de bebidas e alimentos.

Por comparação de métodos de detecção de fungos em três tipos de água (água superficial, água de nascente e água subterrânea) com composições muito diferentes, concluiu-se que a filtração por membrana, usando Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol como meio de cultura será uma técnica adequada para a análise de fungos nestas três matrizes.

Os três tipos de águas estudadas apresentaram variações evidentes no que respeita à ocorrência de bactérias indicadoras de contaminação fecal e fungos. Foi detectada a presença ubíqua de fungos, embora a sua presença seja mais demarcada nas fontes de água sujeitas a factores ambientais – superficial e de nascente.

Os resultados obtidos na análise temporal dos perfis de populações de fungos nas diferentes matrizes demonstraram que diferentes espécies deverão ser encontradas nos diferentes tipos de águas. Foram, por isso, isolados e identificados alguns dos géneros e espécies de fungos filamentosos e leveduras mais frequentemente encontrados em cada tipo de água.

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

Agradecimentos	i
Sumário.....	ii
Índice de Conteúdos	iii
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	viii
1 Introdução.....	1
1.2 Tratamento da Água	1
1.3 Legislação em vigor.....	2
1.4 Bactérias	3
1.4.1 Método de Análise de Coliformes totais e <i>E. coli</i> - Colilert®	5
1.4.2 Método de Análise de Enterococos - Enterolert™	5
1.5 Fungos Filamentosos e Leveduras.....	5
1.5.1 Métodos Clássicos de Análise Micológica.....	7
1.5.2 Métodos de Biologia Molecular para Análise de Fungos	8
1.5.2.1 Extração de DNA de Microrganismos presentes em Águas.....	8
1.5.2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	10
1.5.2.3 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	12
2 Objectivos do trabalho.....	14
3 Materiais e Métodos	15
3.1 Amostragem de água	15
3.2 Ocorrência de bactérias em água ao longo do tempo	15
3.3 Comparação de técnicas para crescimento de fungos presentes em amostras de água ..	16
3.4 Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos presentes em amostras de água.....	17
3.5 Avaliação da variação da ocorrência de fungos presentes em amostras de água ao longo do tempo	18
3.6 Comparação dos perfis das populações de fungos em água por DGGE	18
3.7 Identificação dos fungos filamentosos e leveduras isolados	20
4 Resultados e Discussão.....	21
4.1 Ocorrência de bactérias ao longo do tempo.....	21
4.1.1 Resultados obtidos usando o teste Colilert®	21
4.1.2 Resultados obtidos usando o teste Enterolert™	24

4.2 Comparação de técnicas para crescimento de fungos presentes em amostras de água ..	25
4.2.1 Amostra de água superficial	25
4.2.2 Amostra de água de nascente.....	27
4.2.3 Amostra de água subterrânea.....	28
4.3 Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos presentes em amostras de água.....	30
4.3.1 Amostra de água superficial	30
4.3.2 Amostra de água de nascente.....	32
4.3.3 Amostra de água subterrânea.....	33
4.4 Comparação de diferentes técnicas na análise dos perfis das populações de fungos por DGGE	36
4.5 Comparação de diferentes meios de cultura na análise dos perfis das populações de fungos por DGGE.....	37
4.6 Avaliação da variação da ocorrência de fungos presentes em amostras de água ao longo do tempo	39
4.6.1 Amostra de água superficial	39
4.6.2 Amostra de água de nascente.....	40
4.6.3 Amostra de água subterrânea.....	42
4.7 Comparação dos perfis das populações de fungos ao longo do tempo por DGGE	44
4.8 Fungos filamentosos e leveduras identificados	46
5 Conclusões.....	49
6 Bibliografia.....	51
Anexo A1 – Teste Colilert® (IDEXX Laboratories Inc., Maine, USA) para quantificação de Coliformes totais e <i>E. coli</i>	54
Anexo A2 – Teste Enterolert™ (IDEXX Laboratories Inc., Maine, USA) para quantificação de Enterococos.....	55
Anexo A3 – Filtração por Membrana.....	56
Anexo A4 – Características dos Meios de Cultura Testados.....	57
Anexo A5 – UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories Inc., CA, USA).....	58
Anexo A6 – Epicentre WaterMaster™ DNA Extraction Kit (Epicentre® Biotechnologies, WI, USA).....	60
Anexo A7 – Polymerase Chain Reaction (PCR)	62

Anexo A8 - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) – The DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA)	64
Anexo A9 – Identificação de Fungos Filamentosos	68
Anexo A10 – Identificação de Leveduras	70
Anexo A11 – Quantificação de DNA (valores obtidos a partir do NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer)	71
Anexo A12 – Géis de DGGE	73
Anexo A13 – Comparação dos dados de Ocorrência de Fungos com dados de Precipitação e de Temperatura do Ar	79
Anexo A14 – Comparação dos dados de Ocorrência de Fungos e de Bactérias	81
Anexo A15 – Fungos identificados	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Etapas de um tratamento convencional de água superficial.....	1
Figura 1.2 – Representação esquemática das várias etapas de um ciclo duma reacção de PCR.....	11
Figura 1.3 – Representação esquemática da região do rDNA dos fungos.....	12
Figura 4.1 – Ocorrência (MPN/100mL) de coliformes totais e <i>E. coli</i> ao longo do tempo para os três tipos de amostras de água.....	23
Figura 4.2 – Ocorrência (MPN/100mL) de enterococos ao longo do tempo para os três tipos de amostras de água.....	24
Figura 4.3 – Comparação de técnicas de crescimento de fungos em amostras de água superficial (valor médio de CFU/100mL para cada técnica).....	26
Figura 4.4 – Comparação de técnicas de crescimento de fungos em amostras de água de nascente (valor médio de CFU/100mL para cada técnica).....	27
Figura 4.5 – Comparação de técnicas de crescimento de fungos em amostras de água subterrânea (valor médio de CFU/100mL para cada técnica).....	29
Figura 4.6 – Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos em amostras de água superficial (valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura).....	31
Figura 4.7 – Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos em amostras de água de nascente (valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura).....	33
Figura 4.8 – Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos em amostras de água subterrânea (valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura).....	34
Figura 4.9 – Comparação de perfis de DGGE das populações de fungos presentes em amostras de água resultantes da aplicação de diferentes técnicas para crescimento de fungos.....	36
Figura 4.10 – Comparação de perfis de DGGE das populações de fungos presentes em amostras de água resultantes da aplicação de diferentes meios de cultura para crescimento de fungos.....	38
Figura 4.11 – Ocorrência de fungos ao longo do tempo em água superficial (valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura).....	40
Figura 4.12 – Ocorrência de fungos ao longo do tempo em água de nascente (valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura).....	41
Figura 4.13 – Ocorrência de fungos ao longo do tempo em água subterrânea (valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura).....	43

Figura 4.14 – Comparação dos perfis de DGGE das populações de fungos presentes nos três tipos de água ao longo do tempo (amostras obtidas pela técnica de filtração por membrana com crescimento em meio de cultura DRBC).....	45
Figura A12.1 – Gel de DGGE para comparação de métodos e meios de cultura para crescimento de fungos – Água Superficial – Outubro 2007.....	73
Figura A12.2 – Gel de DGGE para comparação de métodos e meios de cultura para crescimento de fungos – Água de Nascente – Outubro 2007.....	74
Figura A12.3 – Gel de DGGE para comparação de métodos e meios de cultura para crescimento de fungos – Água Subterrânea – Outubro 2007.....	75
Figura A12.4 – Gel de DGGE para avaliação da variação da ocorrência de fungos ao longo tempo – Água Superficial.....	76
Figura A12.5 – Gel de DGGE para avaliação da variação da ocorrência de fungos ao longo tempo – Água de Nascente.....	77
Figura A12.6 – Gel de DGGE para avaliação da variação da ocorrência de fungos ao longo tempo – Água Subterrânea.....	78
Figura A13.1 – Comparação dos valores de ocorrência de fungos ao longo do tempo (CFU/100mL) das amostras de água superficial com os valores de precipitação (mm) e de temperatura do ar (°C) registados nos dias de colheita das amostras em cada mês de análise.....	79
Figura A13.2 – Comparação dos valores de ocorrência de fungos ao longo do tempo (CFU/100mL) das amostras de água de nascente com os valores de precipitação (mm) e de temperatura do ar (°C) registados nos dias de colheita das amostras em cada mês de análise.....	79
Figura A13.3 – Comparação dos valores de ocorrência de fungos ao longo do tempo (CFU/100mL) das amostras de água subterrânea com os valores de precipitação (mm) e de temperatura do ar (°C) registados nos dias de colheita das amostras em cada mês de análise.....	80
Figura A14.1 – Comparação dos valores de ocorrência de fungos (CFU/100mL) e de bactérias (MPN/100mL) ao longo do tempo para as amostras de água superficial.....	81
Figura A14.2 – Comparação dos valores de ocorrência de fungos (CFU/100mL) e de bactérias (MPN/100mL) ao longo do tempo para as amostras de água de nascente.....	81
Figura A14.3 – Comparação dos valores de ocorrência de fungos (CFU/100mL) e de bactérias (MPN/100mL) ao longo do tempo para as amostras de água subterrânea.....	82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Parâmetros da quantificação de DNA e seu significado.....	10
Tabela 4.1 – Ocorrência de coliformes totais e <i>E. coli</i> ao longo do tempo para os três tipos de amostras de água expressos em MPN/100 mL.....	22
Tabela 4.2 – Ocorrência de enterococos ao longo do tempo para os três tipos de amostras de água expressos em MPN/100 mL.....	24
Tabela 4.3 – Comparação de técnicas de crescimento de fungos em amostras de água superficial (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada técnica e número de colônias diferentes por réplica realizada).....	26
Tabela 4.4 – Comparação de técnicas de crescimento de fungos em amostras de água de nascente (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada técnica e número de colônias diferentes por réplica realizada).....	27
Tabela 4.5 – Comparação de técnicas de crescimento de fungos em amostras de água subterrânea (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada técnica e número de colônias diferentes por réplica realizada).....	28
Tabela 4.6 – Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos em amostras de água superficial (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura e número de colônias diferentes por réplica realizada).....	31
Tabela 4.7 – Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos em amostras de água de nascente (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura e número de colônias diferentes por réplica realizada).....	32
Tabela 4.8 – Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos em amostras de água subterrânea (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura e número de colônias diferentes por réplica realizada).....	34
Tabela 4.9 – Ocorrência de fungos ao longo do tempo em água superficial (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura e número de colônias diferentes por réplica realizada).....	39
Tabela 4.10 – Ocorrência de fungos ao longo do tempo em água de nascente (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura e número de colônias diferentes por réplica realizada).....	41
Tabela 4.11 – Ocorrência de fungos ao longo do tempo em água subterrânea (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura e número de colônias diferentes por réplica realizada).....	42

Tabela 4.12 – Exemplos de fungos filamentosos e leveduras isolados e identificados das três amostras de água e respectivos valores de ocorrência registrados.....	47
Tabela A1.1 – Leitura do teste Colilert®: resultados e seu significado.....	54
Tabela A2.1 – Leitura do teste Enterolert™: resultados e seu significado.....	55
Tabela A3.1 – Diluições/volumes utilizados em contínuo para cada matriz em estudo.....	56
Tabela A4.1 – Características dos meios de cultura utilizados.....	57
Tabela A7.1 – Composição da mistura utilizada na primeira reacção de PCR.....	62
Tabela A7.2 – Composição da mistura utilizada na segunda reacção de PCR.....	62
Tabela A7.3 – Programa de PCR utilizado para as duas reacções do <i>nested</i> -PCR.....	63
Tabela A8.1 – Solução stock de tampão TAE 50x.....	64
Tabela A8.2 – Soluções para formação do gradiente num gel a 6% acrilamida.....	64
Tabela A8.3 – Gel Loading Dye (2x).....	64
Tabela A8.4 – Preparação das soluções para formação do gradiente num gel de DGGE....	65
Tabela A11.1 – Quantificação do DNA obtido das amostras resultantes da comparação de diferentes técnicas e meios de cultura para crescimento de fungos presentes em amostras de água.....	71
Tabela A11.2 – Quantificação do DNA obtido das amostras resultantes da avaliação da variação da ocorrência de fungos presentes em amostras de água ao longo do tempo.....	72

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 QUALIDADE DA ÁGUA

As civilizações sempre tiveram tendência a começar e/ou desenvolver-se em locais onde a presença de água fosse abundante, sendo os padrões de qualidade então definidos apenas a sua cor e sabor. Os primeiros tratamentos da água ocorreram no século XVIII e tinham como objectivo a clarificação da água ^[1]. Só mais tarde se começaram a associar algumas patologias (como a cólera ou a febre tifóide) à água e, a partir de então, a qualidade das águas destinadas ao consumo humano tem sido estudada e têm sido definidos diversos parâmetros que atestam a sua potabilidade ^[1,2,3].

Actualmente, uma água para ser considerada potável e, conseqüentemente, passível de ser consumida em qualquer quantidade desejada, deve ser incolor, inodora e insípida. Para além disso, não pode conter organismos potencialmente patogénicos nem compostos orgânicos ou minerais que possam causar efeitos fisiológicos adversos ^[1,3].

1.2 TRATAMENTO DA ÁGUA

Os processos modernos de tratamento de águas funcionam como barreiras que protegem o consumidor evitando doenças provocadas pelo consumo de água poluída. O tratamento mais comum para águas superficiais, referido usualmente como tratamento convencional (figura 1.1), consiste em coagulação, floculação, sedimentação, filtração e desinfecção ^[2].

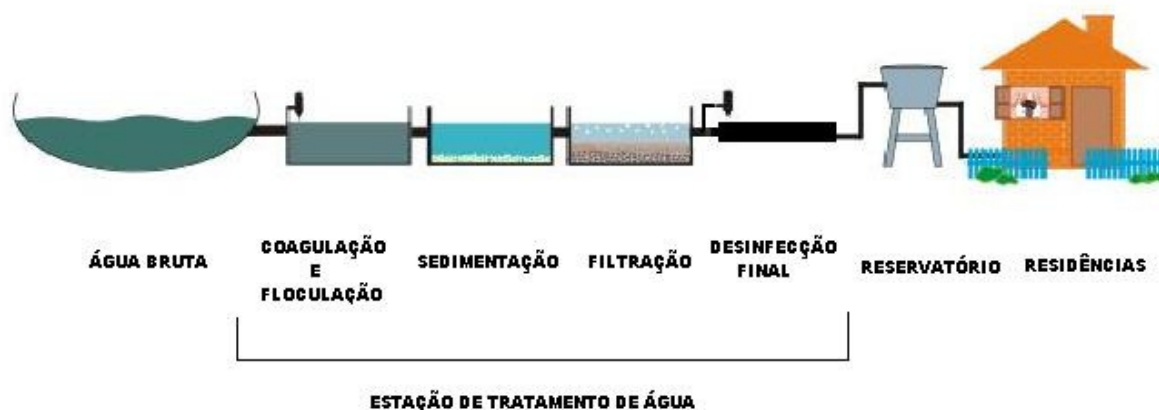


Figura 1.1 – Etapas de um tratamento convencional de água superficial ^{Adaptado de [4]}.

1 INTRODUÇÃO

A coagulação envolve a adição de produtos químicos (como o sulfato de alumínio) de modo a facilitar a remoção de sólidos dissolvidos e em suspensão por sedimentação. Esta etapa permite ainda remover compostos orgânicos ou inorgânicos dissolvidos por reacção destes com os sais metálicos adicionados resultando na formação de precipitados ^[2].

A floculação é um processo estritamente físico em que a água tratada é agitada gentilmente para aumentar a frequência de colisões entre partículas, promovendo assim a formação de partículas de maiores dimensões. Após uma floculação eficiente, a maioria dos agregados irá depositar-se durante a sedimentação (normalmente 1 a 2 horas) ^[2].

A sedimentação é outro processo estritamente físico, que envolve a força gravítica para depositar as partículas suspensas que são mais densas que a água. Os microrganismos retidos ou adsorvidos nas partículas suspensas são também removidos por sedimentação. O efluente resultante pode ser então submetido a uma filtração rápida ou lenta para separar os sólidos ainda em suspensão da água. O meio filtrante é normalmente constituído por areia, antracite ou carvão activado ^[2].

A utilização conjunta dos processos descritos permite a remoção de muitos contaminantes, sendo igualmente importantes para a redução da turbidez da água ^[2].

Para terminar o processo de tratamento é necessária a realização de uma desinfecção final, normalmente recorrendo-se à utilização de cloro, o desinfectante mais comum no tratamento de águas potáveis ^[2].

1.3 LEGISLAÇÃO EM VIGOR

No que concerne à legislação Portuguesa, o Decreto-Lei nº 243/2001, de 5 de Setembro, apresenta as normas relativas à qualidade da água destinada ao consumo humano transpondo a Directiva nº 98/3/CE, do Conselho, de 3 de Novembro para o Direito nacional ^[3]. O Decreto-Lei regula a qualidade da água destinada ao consumo humano e tem por objectivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes de qualquer contaminação da água destinada ao consumo humano, assegurando a sua salubridade e limpeza.

Neste documento são definidos valores paramétricos para as águas no que respeita a parâmetros microbiológicos e químicos. São igualmente definidas a frequência e técnicas de amostragem, métodos a aplicar nas várias determinações, bem como os teores admitidos para cada parâmetro em análise dependendo da utilização a que se destinada a água. Relativamente

1 INTRODUÇÃO

aos parâmetros microbiológicos, e no que respeita a águas destinadas ao consumo humano fornecidas por sistemas de abastecimento público, apenas são definidos valores paramétricos para os microrganismos *Escherichia coli* e Enterococos.

Na legislação em vigor não são definidos quaisquer valores paramétricos para fungos filamentosos e/ou leveduras. Contudo, alguns estudos realizados demonstraram que se podem encontrar fungos em ambientes aquáticos, podendo alguns destes pertencer ao grupo dos potencialmente patogénicos, pelo que é de relevante interesse pesquisar a sua presença em águas destinadas ao consumo humano ^[5].

1.4 BACTÉRIAS

O estudo de amostras ambientais para pesquisa da presença de contaminantes intestinais é por vezes moroso e difícil, pelo que foram definidos alguns microrganismos como indicadores. Algumas bactérias que ocorrem nas fezes de animais de sangue quente podem ser facilmente isoladas e quantificadas por métodos bacteriológicos simples. A detecção de bactérias deste tipo em águas é indicadora da ocorrência de contaminação fecal e sugere que podem também estar presentes organismos patogénicos entéricos ^[2].

As bactérias coliformes são um exemplo de um indicador de contaminação fecal em águas de consumo. O grupo dos coliformes inclui os géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, que são relativamente simples de detectar ^[2].

Apesar de o grupo dos coliformes totais servir como indicador principal de poluição de uma água, muitos dos organismos deste grupo não são apenas de proveniência fecal. Assim, foram desenvolvidos métodos para a detecção de organismos de origem exclusivamente fecal – os coliformes fecais. Estes incluem os géneros *Escherichia* e *Klebsiella*, diferenciados em laboratório pela sua capacidade de fermentar a lactose ^[2].

O método tradicional de detecção de coliformes ^[6] consiste na filtração da amostra ou das suas diluições, através de membrana filtrante de porosidade 0,45 µm, e incubação da membrana em meio de cultura selectivo contendo lactose. Após incubação e contagem das colónias são realizados testes de confirmação. O primeiro é o teste da oxidase: colónias típicas (pela cor e forma que apresentam no meio selectivo) que são oxidase negativas consideram-se coliformes; colónias atípicas que sejam oxidase negativas são repicadas para um meio de confirmação em que a alteração de cor confirma que se tratam de coliformes. Para testar a

1 INTRODUÇÃO

presença de *E. coli* é examinada a produção de fluorescência do meio de confirmação por submissão a luz UV (365 nm) e efectua-se o teste de produção de indol (resultado positivo quando na presença de *E. coli*).

Bactérias do género *Enterococcus*, têm sido referenciadas como um importante indicador de risco de gastroenterites provocadas por águas destinadas a banhos ^[2]. O método tradicional para detecção de enterococos ^[7] consiste na filtração da amostra ou das suas diluições, através de membrana filtrante de porosidade 0,45 µm, e incubação da membrana em meio de cultura selectivo contendo azida de sódio para inibir o crescimento de bactérias gram-negativas. Após incubação são contadas as colónias típicas (pela cor e forma que apresentam no meio selectivo) e a membrana é transferida para um meio de confirmação contendo bÍlis azida esculina que é hidrolisada pelos enterococos fecais.

Para testar a presença destes dois grupos de organismos em amostras de água foram desenvolvidos pela IDEXX Laboratories, Inc. (Maine, USA) métodos de detecção rápida (24 horas). Estes apresentam vantagens por reduzirem o tempo de análise pelo facto de prescindirem de pré-tratamento das amostras, da preparação de diluições, de incubações por períodos de tempo relativamente elevados ou da realização testes de confirmação. Contudo, baseiam-se no método de *Most Probable Number* (MPN), o que poderá ser considerado desvantajoso relativamente aos métodos tradicionais que permitem obter contagens reais de microrganismos viáveis em meio de cultura ^[8,9].

O método utiliza um quantificador (*Quanti-Tray*[®]/2000) baseado no modelo estatístico tradicional de diluições seriadas em 15 tubos. No método de diluição seriada, diferentes diluições têm de ser previamente preparadas para depois serem dispensadas numa quantidade fixa de cada em vários tubos. Utilizando o *Quanti-Tray*[®]/2000 a amostra é automaticamente dividida pelos vários poços (ao passar pelo *Quanti-Tray*[®] Sealer), sem serem necessários diversos tubos ou preparar diluições. Pela distribuição automática da amostra nos 97 poços de dois tamanhos diferentes, o *Quanti-Tray*[®]/2000 permite uma quantificação entre 1 e 2419 organismos/100 mL com um intervalo de confiança a 95% muito superior ao possível pelo método tradicional ^[8].

1 INTRODUÇÃO

1.4.1 MÉTODO DE ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E *E. coli* - COLILERT[®]

O sistema Colilert da IDDEX trata-se de um teste rápido utilizado para detecção de coliformes e *E. coli* em águas destinadas ao consumo humano que permite obter resultados em apenas 24 horas e detecta coliformes e *E. coli* até 1 organismo/100 mL. Este teste utiliza a *Defined Substrate Technology*[®] (DST[®]) para os nutrientes indicadores ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosida) e MUG (4-metil-umbeliferil- β -D-glucoronida) que permitem quantificar coliformes totais e *E. coli*, respectivamente. Os coliformes possuem a enzima β -D-galactosidase que lhes dá a capacidade de metabolizar o ONPG, produzindo um produto (*o*-nitrofenol) que lhes confere a cor amarela [8].

A *E. coli* tem também a capacidade de metabolizar o MUG, o que resulta na formação de um produto (4-metil-umbeliferona) que emite fluorescência [8,9].

1.4.2 MÉTODO DE ANÁLISE DE ENTEROCOCOS - ENTEROLERT[™]

O teste Enterolert (IDDEX) pode ser utilizado para quantificar enterococos em apenas 24 horas e que permite detectar até 1 organismo/100 mL. Este teste também utiliza a *Defined Substrate Technology*[®] (DST[®]) para os nutrientes indicadores de enterococos, baseando-se na actividade da β -glucosidase em enterococos e consequente produção de 4-metil-umbeliferilona a partir de MUG, emitindo fluorescência [8,9]. A DST aumenta a precisão e permite uma diminuição da necessidade de supressores da azida de sódio utilizada nos métodos tradicionais [8].

Algumas das espécies de enterococos detectadas pelo teste Enterolert são: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. durans* [8].

1.5 FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS

Os fungos, incluindo fungos filamentosos e leveduras, encontram-se distribuídos ubiquamente na natureza, são organismos eucarióticos, heterotróficos, com um núcleo organizado e possuem, geralmente, paredes rígidas ricas em quitina [5,10].

Como os fungos possuem um elevado potencial enzimático podem degradar activamente substâncias naturais complexas e certos compostos sintéticos, incluindo alguns pesticidas. A

1 INTRODUÇÃO

maioria dos fungos são aeróbios ou microaerofílicos, apesar de algumas espécies demonstrarem um reduzido metabolismo anaeróbico; existe ainda um pequeno grupo que é capaz de crescer em condições de total anaerobiose ^[5].

A associação entre os fungos e a matéria orgânica sugere que alguns poderão ser indicadores importantes de poluição, nomeadamente algumas espécies características de águas mais quentes que poderão funcionar como indicadoras de poluição termal ^[5].

Em água existem dois tipos básicos de fungos: os verdadeiros fungos aquáticos, que produzem zoósporos ou gâmetas e possuem mobilidade por meio de flagelos, e os fungos que não possuem mobilidade em qualquer estágio do seu ciclo de vida mas que crescem e se reproduzem normalmente de forma assexuada ^[5].

Os fungos estão presentes em ambientes aquáticos diversos, incluindo lagos, lagoas, rios, ribeiros, estuários, sedimentos, ambientes marinhos, águas residuais, lamas, águas pluviais rurais e urbanas, poços, drenagens de minas ácidas, refinarias e sistemas de ejeção de combustíveis. Também foram encontrados fungos em águas potáveis e no interior das tubagens dos sistemas de distribuição de águas. Estes, ou sobreviveram aos tratamentos ou entraram no sistema após o tratamento e aí permaneceram viáveis; em qualquer dos casos, os esporos podem permanecer viáveis por longos períodos de tempo. O sabor e o cheiro na água potável são normalmente associados à presença de organismos procarióticos tais como bactérias, actinomicetas e cianobactérias embora os fungos possam também ser responsáveis por aquelas características organolépticas ^[5].

Estudos de águas potáveis em hospitais e habitações privadas indicam que o sistema público de distribuição de água poderá contribuir para a transmissão de fungos alergénicos e oportunistas, uma vez que estes conseguem escapar aos processos de filtração por areia e de desinfecção ^[1,11]. Estes são transportados na água na sua forma de conídios mas também na forma de fragmentos de hifas. Alguns fungos são ainda capazes de esporular quando submersos e podem crescer com baixas concentrações de oxigénio ^[12].

Alguns fungos podem ser patogénicos para o Homem e constituem um grupo morfológica, ecológica e clinicamente diverso, o que sugere que o seu potencial de patogenicidade ^[13].

Os fungos podem ser causadores de algumas doenças do foro respiratório e os pertencentes ao grupo dos dermatófitos podem provocar problemas ao nível da pele. Podem ainda causar várias doenças, nomeadamente o foro alérgico, decorrentes da secreção de toxinas – as micotoxinas ^[14,15].

1 INTRODUÇÃO

Esporos dos fungos filamentosos e fragmentos de hifas podem formar aerossóis no ar interior quando as águas contaminadas passam por chuveiros, torneiras ou cisternas, podendo resultar numa exposição respiratória a espécies potencialmente nocivas ^[16]. Alguns exemplos destes fungos são: *Geotrichum candidum*, um fungo produtor de artroconídios, possivelmente associado a doenças e frequentemente isolado de águas poluídas; *Aspergillus fumigatus* está descrito como agente causador da aspergilose pulmonar, é também frequentemente isolado; a levedura *Candida albicans*, que pode provocar infecções pulmonares, orais ou vaginais, tem sido encontrada em águas de recreio ^[5,11]. Indivíduos imunocomprometidos podem estar particularmente susceptíveis à sua acção ^[13].

A capacidade dos fungos de produzir compostos diferentes não se reduz a uma actividade nociva, pois podem também produzir compostos importantes para as indústrias alimentar, farmacêutica e química ^[14].

1.5.1 MÉTODOS CLÁSSICOS DE ANÁLISE MICOLÓGICA

Os fungos existem numa variedade de estados físicos e morfológicos que os torna difíceis de quantificar e identificar por técnicas de cultura. As técnicas para crescimento de fungos incluem a incorporação, o espalhamento e a filtração por membrana ^[2].

A técnica de incorporação é uma técnica simples e pode ser utilizada para volumes de amostra ou diluições que variem entre 0,1 a 2,0 mL. As colónias formadas são relativamente pequenas e compactas, apresentando uma menor tendência para se sobreporem umas às outras comparando com as que são produzidas por crescimento à superfície. Por outro lado, as colónias imersas crescem mais devagar e são difíceis de transferir. Para temperar o agar é necessário um banho termostaticamente controlado, embora ainda assim os microrganismos possam ser sujeitos a um choque térmico por contacto da amostra com o agar a cerca de 45°C ^[5].

A técnica de espalhamento não provoca um choque térmico e todas as colónias crescem à superfície do agar, onde podem ser rapidamente distinguidas de partículas ou bolhas. As colónias podem ser facilmente transferidas e a distinção de morfologias é mais fácil, permitindo compará-las com as descrições na literatura. Contudo, este método está limitado a pequenos volumes de amostra ou diluições que podem ser absorvidos pelo agar: 0,1 a 0,5 mL, dependendo do grau de secagem da placas com o meio de cultura ^[5].

1 INTRODUÇÃO

A técnica de filtração por membrana permite testar maiores volumes de amostra de água de reduzida turbidez e é o método preferencial para águas com baixas contagens de microrganismos (<1 a 10 CFU/mL); não induz um choque térmico mas acumula o custo das membranas. Outras desvantagens incluem uma pequena área de exposição, as células podem ser danificadas por excesso de pressão durante a filtração e a qualidade da membrana filtrante pode não ser constante ^[5].

A quantificação dos fungos não é equivalente à das bactérias unicelulares pois os fungos podem formar colónias a partir de uma única célula (esporo), de um agregado celular (um *cluster* de esporos ou um único esporo multicelular) ou a partir de fragmentos de micélio ou de pseudo-micélio (contendo uma ou mais células viáveis). Assume-se, que cada colónia tem origem numa única unidade formadora de colónia (CFU – Colony Forming Unit) ^[5].

1.5.2 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA ANÁLISE DE FUNGOS

Nas últimas duas décadas têm ocorrido grandes alterações no modo como os microbiólogos estudam as comunidades microbiológicas. As limitações associadas aos métodos tradicionais têm vindo a incentivar o desenvolvimento de técnicas independentes de cultivo e baseadas na análise dos ácidos nucleicos. Os métodos moleculares permitem ultrapassar as limitações do cultivo, revelando a importância da flora microbiana “não-cultivável” ^[17].

O uso de técnicas moleculares não exclui as técnicas microbiológicas tradicionais. Pelo contrário, podem ser utilizadas em conjunto para aquisição de resultados mais exactos e compreensíveis ^[17].

1.5.2.1 EXTRACÇÃO DE DNA DE MICRORGANISMOS PRESENTES EM ÁGUAS

A extracção de DNA de qualidade é um passo chave na identificação de microrganismos e a metodologia a aplicar depende do tipo de amostra ^[18].

De um modo geral, os microrganismos presentes em águas têm de ser concentrados antes da extracção de DNA, sendo os métodos mais comuns para este efeito a centrifugação e/ou a

1 INTRODUÇÃO

filtração prévia da amostra. A filtração é, com efeito, o método mais utilizado, pois permite também a eliminação de contaminantes tais como compostos orgânicos e inorgânicos presentes nas águas, que podem comprometer as reacções seguintes necessárias à continuação do processo (ex. a amplificação do DNA). A filtração permite ainda que o filtro seja cortado em pequenos pedaços para utilização directa na extracção do DNA dos microrganismos retidos ^[18].

No caso da extracção de DNA de fungos, um dos factores a ter em conta é a constituição da parede celular destes, que consiste em finas camadas de quitina, (1-3)- β -D-glucano, (1,6) β -glucanos, lípidos e péptidos, podendo estar também presente uma dura camada superficial de melanina altamente resistente à luz UV, digestão enzimática e decomposição química ^[19].

Actualmente existem diversos kits para extracção de DNA de fungos que permitem contornar os problemas resultantes da constituição da parede celular destes, bem como problemas inerentes aos diferentes processos de pré-tratamento das amostras que contêm o DNA a extrair.

Uma extracção de DNA eficiente pode ser comprovada pela realização de uma electroforese em gel de agarose e/ou pela sua quantificação.

Numa electroforese em gel de agarose é aplicada uma voltagem ao gel que se encontra imerso numa solução tamponada. No gel, que contém pequenos poços, são colocadas as amostras de DNA, e a voltagem aplicada fará com que o DNA migre em direcção ao ânodo devido à carga negativa dos fosfatos ao longo da cadeia de DNA ^[2]. Após a revelação do gel (por exemplo, por imersão do mesmo numa solução de brometo de etídeo, seguida de exposição a radiação UV) deve-se observar uma só banda, bem definida e intensa, o que corresponde, normalmente, a uma extracção eficiente e a uma amostra de DNA de qualidade.

Uma extracção de DNA eficiente poderá ser também confirmada pela quantificação do mesmo. Pela quantificação do DNA, que pressupõe a medição de absorvâncias a diferentes comprimentos de onda, além de se determinar a concentração do DNA é também possível inferir acerca da existência de contaminantes no DNA extraído. Assim, devem-se considerar os parâmetros seguintes:

1 INTRODUÇÃO

Tabela 1.1 – Parâmetros da quantificação de DNA e seu significado ^[20].

Parâmetro	Significado
Abs _{260 nm}	Comprimento de onda a que absorvem os ácidos nucleicos
Abs _{280 nm}	Comprimento de onda a que absorvem as proteínas e os fenóis
Abs _{230 nm}	Comprimento de onda a que absorvem o EDTA, os polissacáridos e o etanol
$\frac{Abs_{260}}{Abs_{230}}$	Mede o grau de pureza dos ácidos nucleicos e varia normalmente entre 1,8 – 2,2 (valores muito abaixo destes podem indicar a presença de contaminantes co-purificados)
$\frac{Abs_{260}}{Abs_{280}}$	Mede o grau de pureza do DNA e do RNA; um valor de ~1,8 (para o DNA) corresponde normalmente a uma amostra “pura” (valores muito abaixo deste podem indicar a presença de proteínas, fenóis ou outros contaminantes que absorvam a cerca de 280 nm)

1.5.2.2 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

A reacção de PCR é uma técnica utilizada para aumentar exponencialmente concentrações de fragmentos de DNA específicos de modo a fornecer material genético suficiente para identificação por técnicas como a sequenciação ^[21].

A amplificação por PCR convencional envolve a repetição de ciclos de desnaturação da cadeia molde de DNA, ligação dos *primers* e extensão da polimerase para amplificar uma sequência de DNA específica e determinada por dois *primers* oligonucleotídicos (figura 1.2). A capacidade de um oligonucleótido de servir como *primer* pode depender da cinética de associação e dissociação entre o *primer* e a cadeia molde com variações nas temperaturas de ligação e extensão dos *primers* e com a estabilidade deste par na troca de nucleótidos e sua localização. Os *primers*, que são únicos para a sequência alvo a amplificar, devem respeitar alguns critérios tais como comprimento do *primer*, conteúdo CG, temperaturas de ligação e extensão, estabilidade da extremidade 5', especificidade da extremidade 3', etc ^[19].

1 INTRODUÇÃO

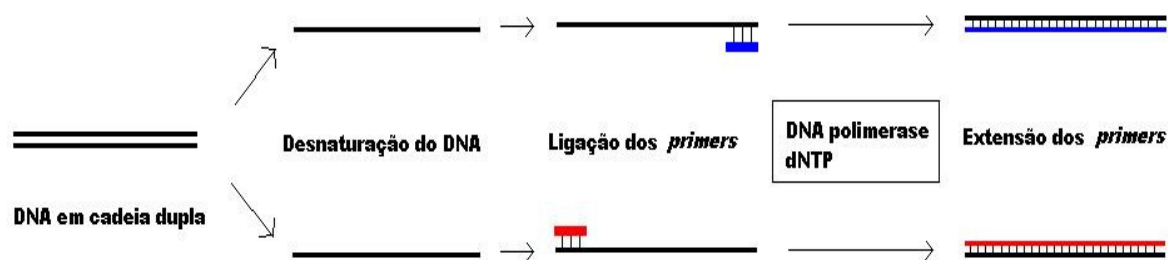


Figura 1.2 – Representação esquemática das várias etapas de um ciclo numa reacção de PCR ^{Adaptado de [22]}.

Vários *primers* de PCR têm sido descritos para amplificar rDNA de fungos a partir de uma vasta gama de grupos taxonómicos, sendo alguns desenhados para utilizar DNA extraído de comunidade mistas ^[23].

A identificação taxonómica dos fungos com base nas sequências das subunidades pequenas ribossomais eucarióticas, o rRNA 18S, está normalmente limitada ao género ou ao nível da família. Isto deve-se, principalmente, à relativa falta de variabilidade nos genes rRNA 18S entre espécies fúngicas estreitamente relacionadas, como resultado do período relativamente curto de evolução do reino dos fungos comparativamente com o das bactérias ^[24].

A região ITS, que contém duas regiões não codificantes variáveis, localiza-se entre os genes 18S e 28S, e incorpora o gene 5.8S (figura 1.3) ^[24,25,26], é uma alternativa viável para identificação de fungos. Vários *primers* foram desenhados para a amplificação de diversos segmentos do gene rDNA de fungos. O par de *primers* ITS1 – ITS4 foi referenciado para a amplificação da região ITS do rRNA de fungos. O par de *primers* ITS5 – ITS4 é uma boa alternativa a esta combinação, já que o *primer* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGC-3') está localizado 25 bp a 5' do *primer* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ^[27].

Posteriormente, foram desenhados os *primers* ITS1F e ITS4B para amplificar especificamente a região ITS dos fungos, sem co-amplificação do DNA de plantas ou outros eucariotas ^[23,25]. Reacções incluindo o *primer* selectivo para fungos ITS1F mostraram ser eficientes na amplificação de todas as amostras de fungos basidiomicota e ascomicota testados ^[25]. Já a utilização conjunta dos *primers* ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') é

1 INTRODUÇÃO

específica para amplificar DNA de fungos presentes em amostras de DNA de comunidades [24,28], uma vez que estes *primers* são específicos para fungos dos grupos *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Zygomycota* [29].

Regiões não codificantes do rDNA, tal como a região ITS, beneficiam de uma taxa de evolução mais elevada, o que resulta numa maior variação nas sequências entre espécies relacionadas quando comparando com as regiões codificantes mais conservadas do *cluster* do gene rRNA [24]. Assim, as sequências ITS nos fungos fornecem geralmente uma maior resolução taxonómica que as sequências originadas das regiões codificantes [24,27].

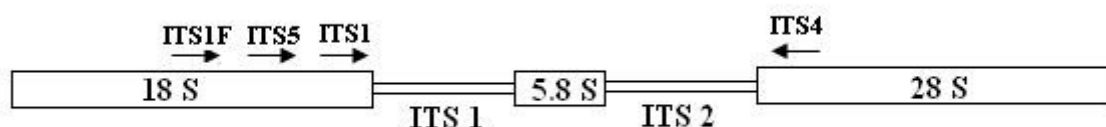


Figura 1.3 – Representação esquemática da região do rDNA dos fungos ^{Adaptado de [28]}.

Várias características tornam a região ITS conveniente para a identificação molecular de fungos: (i) toda a região tem normalmente entre 600 e 800 bp de comprimento e pode ser amplificada utilizando *primers* universais específicos para os genes do rRNA; (ii) a natureza de cópia múltipla do rDNA repetitivo torna a região ITS relativamente fácil de amplificar a partir de amostras pequenas, diluídas ou altamente degradadas de DNA; (iii) a região ITS é por vezes muito variável entre espécies de fungos taxonomicamente distintas ou de isolados da mesma espécie [25,26,30].

Uma potencial desvantagem da utilização da região ITS para a identificação de fungos simbioses é que a maioria dos *primers* disponíveis estão desenhados para amplificar uma vasta gama de organismos que inclui fungos, plantas, protistas e animais [25]. Outra desvantagem prende-se com o facto de, em alguns casos, serem detectados simultaneamente os organismos viáveis e os não viáveis. Também os contaminantes podem ser um problema quando se consideram falsos-positivos como resultado de uma reacção de PCR [2].

1.5.2.3 DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (DGGE)

O DGGE é um método electroforético capaz de detectar diferenças entre fragmentos de DNA com o mesmo tamanho mas com sequências diferentes [31,32]. Esta separação baseia-se

1 INTRODUÇÃO

na diminuição da mobilidade electroforética de uma molécula de DNA num gel de poliacrilamida com um gradiente linear de desnaturantes de DNA (uma mistura de ureia e formamida). Como a temperatura do gel é mantida constante, a separação dos domínios varia de acordo com a concentração dos desnaturantes e, portanto, varia também a sua posição no gel ^[2,31].

Os fragmentos de DNA a serem colocados num gel DGGE são produtos de PCR. A adição de 30 a 40 bp de uma cauda GC a um dos *primers* garante que parte do fragmento de DNA vai permanecer parcialmente em cadeia dupla e que fragmentos com apenas algumas bases de diferença serão eficientemente separados com o aumento linear do gradiente desnaturante ^[2,31,32].

Esta técnica beneficia da capacidade de analisar e comparar várias amostras num único gel e permite assim uma comparação rápida e simultânea de várias amostras. A precisão desta comparação está, contudo, muito dependente da inclusão de padrões internos e de se assumir que a resolução e qualidade dos géis foi mantida entre todos. Isto é particularmente essencial quando se pretende comparar diferentes géis entre si como resultado de um elevado número de amostras ^[24]. A técnica de DGGE é também condicionada pela qualidade do DNA utilizado, sendo muito importante a eficiência das etapas de extracção e purificação do DNA.

Esta técnica é também muito útil para a detecção de mutações numa sequência alvo, uma vez que permite a separação de produtos de DNA com o mesmo tamanho mas com diferenças na sequência de nucleótidos e pode ser utilizado para distinguir uma alteração de uma única base ^[26].

A técnica de DGGE tem já aplicações confirmadas no estudo de comunidades microbianas, nomeadamente em estudos de diversidade e ecologia de fungos em solos ^[24], caracterização de comunidades bacterianas em terrenos húmidos ^[21], estudos de comunidades bacterianas complexas e alterações nessas comunidades ^[31] ou para diferenciação de espécies bacterianas isoladas de alimentos ^[32].

Apesar de todas as vantagens do DGGE, como no caso do traçado de perfis de comunidades, existem também algumas desvantagens. De um modo geral, pequenos fragmentos de DNA resultam numa melhor resolução entre bandas num perfil (fragmentos de tamanho inferior a 500 bp), limitando assim a informação taxonómica que se pode obter por sequenciação das bandas excisadas, apesar de alguns produtos maiores poderem ser usados com sucesso em alguns casos. Há ainda casos em que se provou que uma única banda no gel pode compreender mais do que apenas um tipo de sequência ^[24].

2 OBJECTIVOS DO TRABALHO

2 OBJECTIVOS DO TRABALHO

O presente trabalho enquadra-se num projecto em curso no grupo de Microbiologia de Ambientes Humanos do ITQB/IBET, que estuda processos alternativos de tratamento de água para consumo.

Os principais objectivos deste estudo eram:

- Validar métodos de detecção e quantificação de fungos em diversas águas por comparação de diferentes técnicas de crescimento (filtração por membrana, espalhamento e incorporação) e meios de cultura (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol, Sabouraud Dextrose Agar, Czapek-Dox Agar, Malt Extract Agar e Dichloran-Glycerol Chloramphenicol Agar);
- Testar a ocorrência e a variabilidade temporal dos fungos e bactérias em águas com composições muito diferentes (água de superfície, água de nascente e água subterrânea) discutindo as diferenças em termos de unidades formadoras de colónias (CFU – Colony Forming Unit) por unidade de volume;
- Isolar e identificar os tipos de fungos mais frequentemente encontrados com base na morfologia e outras características fenotípicas;
- Avaliar a diversidade dos fungos em termos de comunidades utilizando técnicas de biologia molecular, tal como o DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), para compreender o efeito da utilização de diferentes técnicas de crescimento e as variações ao longo do tempo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM DE ÁGUA

A análise de diferentes parâmetros microbiológicos (fungos filamentosos, leveduras, coliformes totais, *E. coli* e enterococos) foi realizada em três matrizes de águas diferentes - água superficial, água subterrânea e água de nascente, situadas num raio de aproximadamente 100 Km.

A colheita das amostras das diferentes águas a analisar foi realizada para frascos SHOTT DURAN®, previamente esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos. Após a colheita, as amostras foram conservadas a 4°C por um período não superior a 24 horas até à realização das análises.

3.2 OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS EM ÁGUA AO LONGO DO TEMPO

Além da quantificação dos fungos filamentosos e leveduras, procedeu-se também à quantificação de bactérias Coliformes totais e *E. coli* e de Enterococos. Para tal utilizaram-se os testes rápidos disponíveis comercialmente: Colilert® (IDEXX Laboratories Inc., Maine, USA) ^[5] para quantificação de coliformes totais e *E. coli* e Enterolert™ (IDEXX Laboratories Inc., Maine, USA) para quantificação de enterococos.

Em qualquer dos casos o teste consiste em adicionar o conteúdo de uma embalagem a 100 mL de amostra de água e agitar até dissolução completa. A mistura é então colocada no Quanti-Tray®/2000 e este selado para posterior incubação a 35°C ± 0,5°C (Colilert®) ou a 41°C ± 0,5°C (Enterolert™), durante 24 horas (ver Anexos A1 e A2).

A realização destes testes paralelamente ao crescimento de fungos teve por objectivo tentar compreender se existe alguma relação entre a quantidade destas bactérias (indicadoras de contaminação fecal) e a quantidade de fungos filamentosos e leveduras presentes numa água.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3 COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS PARA CRESCIMENTO DE FUNGOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Para testar qual a técnica de crescimento que melhor se adequa às três matrizes de água foram realizadas comparações entre as técnicas de filtração por membrana, espalhamento e incorporação em diferentes alturas do ano (Outubro de 2007, Maio e Agosto de 2008).

A filtração por membrana ^[5] (descrita no anexo A3) consistiu em filtrar 100 mL, em triplicado, de amostras das diferentes matrizes por uma membrana de 47 mm e de poro 0,45 µm (Millipore[®], MA, USA). Cada filtro foi depois colocado numa placa de Petri contendo um meio de cultura apropriado ao crescimento dos fungos (Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar – DRBC (Oxoid Ltd, Cambridge, UK) e suplementado com cloranfenicol para prevenir o crescimento de bactérias.

A técnica do espalhamento ^[5] consistiu em espalhar uniformemente 100 µL de amostra sobre DRBC em placas de Petri, tendo sido efectuadas 5 réplicas. As placas devem ser deixadas em repouso até que todo o inóculo seja absorvido pelo meio de cultura antes de incubar.

O método de incorporação ^[5] consistiu em misturar 1 mL de amostra e 10 mL de meio de cultura (DRBC) líquido em placas de Petri, tendo sido efectuadas 5 réplicas. Para homogeneizar a mistura, as placas devem ser agitadas com movimentos circulares suaves, sendo depois deixadas em repouso até que o meio de cultura (que contém agar a 15%) solidifique.

Todas as placas foram colocadas numa incubadora por um período de 7 dias à temperatura de 25°C. As placas foram observadas de dois em dois dias de modo a controlar/avaliar o crescimento microbiano.

Após 7 dias de incubação foi realizada a contagem de todas as colónias de fungos filamentosos e leveduras, sendo os valores obtidos expressos em unidades formadoras de colónias por 100mL (CFU/100mL). Seguidamente, e com base no aspecto macroscópico das colónias, seleccionou-se uma de cada tipo diferente por cada amostra de água analisada e procedeu-se ao seu isolamento com o objectivo de as seleccionar para posterior identificação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4 COMPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA CRESCIMENTO DE FUNGOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Vários meios de cultura (DRBC, Sabouraud Dextrose Agar, Czapek-Dox Agar, Dichloran-Glicerol Chloramphenicol Agar (DGC-18) e Malt Extract Agar (MEA) (Oxoid Ltd, Cambridge, UK)) foram ainda testados para determinar qual o que melhor se adequava à pesquisa de fungos em águas. Os meios de cultura foram seleccionados para este teste atendendo às especificações de cada um, sendo escolhidos de entre os muitos disponíveis no mercado aqueles que eram indicados para o crescimento da maior diversidade possível de fungos filamentosos e leveduras simultaneamente. Os meios DRBC, DGC-18 e MEA são meios gerais para crescimento de fungos; o meio Sabouraud Dextrose Agar está também indicado para o crescimento de fungos filamentosos e leveduras, com especial referência a fungos dermatófitos; o meio Czapek-Dox Agar está especialmente indicado para a pesquisa de fungos pertencentes aos géneros *Penicillium* e *Aspergillus*, devendo-se a sua escolha à previsão de que estes poderiam ser encontrados nas matrizes em estudo (ver Anexo 4) ^[33]. Todos os meios de cultura foram suplementados com cloranfenicol (Oxoid Ltd, Cambridge, UK) para prevenir o crescimento de bactérias.

Para a realização deste teste em diferentes alturas do ano (Outubro de 2007, Maio e Agosto de 2008) foi utilizado o método de filtração por membrana (ver Anexo A3) e, tal como na comparação de técnicas, a incubação teve lugar por um período de 7 dias à temperatura de 25°C, com observação das placas de dois em dois dias para controlar/avaliar o crescimento microbiano.

Após a incubação foi realizada a contagem de todas as colónias de fungos filamentosos e leveduras, seguindo-se o isolamento destes para posterior identificação de acordo com os mesmos critérios estabelecidos para a comparação de técnicas.

Foi então seleccionado um meio de cultura para a quantificação de fungos totais (fungos filamentosos e leveduras) ao longo do tempo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.5 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE FUNGOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA AO LONGO DO TEMPO

Após os primeiros testes realizados, foram seleccionados o método de filtração por membrana e o meio de cultura DRBC para serem utilizados nas análises realizadas mensalmente aos três tipos diferentes de águas em estudo. Esses primeiros testes permitiram ainda a determinação das diluições e volumes indicados para a análise de cada uma das matrizes em estudo (ver Anexo A3, tabela A3.1).

Todas as amostras obtidas ao longo do período de estudo (entre Outubro de 2007 e Agosto de 2008) foram analisadas relativamente à ocorrência de fungos em água ao longo do tempo.

Todas as placas foram colocadas numa incubadora por um período de 7 dias à temperatura de 25°C. As placas foram observadas de dois em dois dias de modo a controlar/avaliar o crescimento microbiano.

Tal como descrito para as comparações de técnicas e meios de cultura, também neste caso foi realizada a contagem de todas as colónias de fungos filamentosos e leveduras após 7 dias de incubação, sendo os valores obtidos expressos em unidades formadoras de colónias por 100mL (CFU/100mL). Seguidamente, e com base no aspecto macroscópico das colónias, seleccionou-se uma de cada tipo diferente por cada amostra de água analisada e procedeu-se ao seu isolamento para posterior identificação.

3.6 COMPARAÇÃO DOS PERFIS DAS POPULAÇÕES DE FUNGOS EM ÁGUA POR DGGE

Como complemento dos estudos acima referidos pretendeu-se a comparação dos mesmos parâmetros com base em técnicas de biologia molecular. Para tal seleccionou-se a técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) com o objectivo de comparar os perfis das comunidades fúngicas presentes nos diferentes tipos de água. Esta técnica baseia-se em diferenças nas sequências de DNA.

Das várias réplicas de placas com crescimento fúngico obtidas para cada amostra escolheu-se a que apresentava a melhor relação entre quantificação (CFU/100mL) e representatividade de fungos (fungos filamentosos e leveduras). Seleccionou-se, portanto, para cada tipo de água, um conjunto de placas com crescimento fúngico proveniente de cada técnica (filtração por membrana, espalhamento e incorporação), um outro conjunto de placas

3 MATERIAIS E MÉTODOS

resultantes do ensaio de diferentes meios de cultura (DRBC, Sabouraud, Czapek, DGC-18 e MEA – Oxoid Ltd, Cambridge, UK) e ainda uma placa resultante das análises realizadas em cada mês (pelo método de filtração por membrana com crescimento fúngico em meio de cultura DRBC). Destas placas foi extraído o DNA dos fungos presentes, utilizando-se o *UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit* (Mo Bio Laboratories Inc., CA, USA) seguindo as instruções do fabricante (ver Anexo A5).

Procedeu-se ainda a uma filtração adicional de cada tipo de água, sendo a membrana resultante guardada em recipiente estéril a -20°C. Neste caso utilizou-se um kit indicado para a extracção de DNA a partir de membranas de filtração, o *WaterMaster™ DNA Purification Kit* (Epicentre® Biotechnologies, WI, USA) (ver anexo A6).

Foi feita uma comparação entre os dois kits de extracção de DNA e verificou-se que os resultados obtidos com kits diferentes são semelhantes para o mesmo processamento da membrana.

O DNA obtido, após quantificação com o NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, foi amplificado por reacção de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em duas etapas, neste caso, uma reacção de PCR semi-*nested* (ver Anexo A7). As reacções de PCR *nested* (dois pares de *primers* diferentes) ou semi- *nested* (apenas um *primer* muda de uma reacção para a outra) são normalmente utilizadas quando se pretende a amplificação do DNA de um grupo restrito (recorrendo-se à utilização de *primers* específicos numa das etapas) ou para melhorar a qualidade de DNA resultante da primeira etapa (podendo, neste caso, utilizar-se ou não o mesmo par de *primers* nas duas etapas).

No caso das nossas amostras a utilização de uma reacção de PCR semi-*nested* teve dois objectivos: (1) garantir que não era amplificado DNA de outros eucariotas (especialmente no caso das amostras de DNA obtidas a partir das membranas que não estiveram em contacto com meio de cultura); (2) adicionar ao DNA amplificado uma cauda CG (para garantir a competência deste DNA para ser usado em DGGE). Na primeira etapa de PCR foram utilizados os *primers* ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') – específico para amplificar a região ITS do DNA de fungos – e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') - *primer* geral para eucariotas; na segunda etapa foram utilizados os *primers* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGC-3') com cauda CG e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') – ambos gerais para eucariotas.

Para testar a qualidade do DNA (obtido directamente da extracção ou após amplificação por PCR) este foi submetido a uma electroforese em gel de agarose a 1,2% (em TAE), 100 V.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

No final o gel foi revelado por imersão em solução de brometo de etídeo após a corrida. A detecção das bandas formadas foi efectuada usando radiação Ultra-Violeta (365 nm) em transiluminador UVItec STX 26M; os géis foram fotografados usando uma câmara Kodak DC-120.

Os produtos de PCR obtidos foram então submetidos a DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) utilizando o *The DCode™ Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad Laboratories Inc., CA; USA). O gradiente de desnaturação utilizado foi de 25% - 75% ^[34], num gel a 6% de Acrilamida/Bis a 40% (valor de referência para separar fragmentos de DNA com 300 – 1000 bp). Após uma corrida de 16 horas a 80 V ^[34], cada gel foi incorporado numa solução de SYBR® Gold (Invitrogen™ - Molecular Probes™, OR, USA) e revelado por exposição a radiação Ultra-Violeta (365 nm). Os géis foram fotografados e posteriormente tratados com o *software* BioNumerics, version 5.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) (ver Anexo A8).

3.7 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS ISOLADOS

No caso dos fungos filamentosos a identificação foi efectuada com base nas características macroscópicas das colónias isoladas – cor da colónia, forma, tamanho, etc. – conjuntamente com as observações microscópicas das estruturas de frutificação dos fungos isolados – estruturas presentes, tamanho e forma dos esporos, etc. – (ver Anexo A9). No caso das leveduras a identificação foi realizada recorrendo a galerias API ID 32 C (BioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, France), um sistema padronizado para a identificação de culturas puras de leveduras com base em reacções de fermentação/assimilação de açúcares (ver Anexo A10).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS AO LONGO DO TEMPO

Para as amostras dos diferentes tipos de água (água superficial, água de nascente e água subterrânea), recolhidas entre Novembro de 2007 e Agosto de 2008, foi realizada a quantificação das bactérias coliformes totais, *E. coli* e enterococos, pelo método do Número Mais Provável (MNP). Foram usados os testes Colilert® (para quantificação de coliformes totais e *E. coli*) e Enterolert™ (para quantificação de enterococos).

4.1.1 RESULTADOS OBTIDOS USANDO O TESTE COLILERT®

Os resultados obtidos (MPN/100 mL) ao longo do tempo no que respeita à quantificação de bactérias estão representados na Tabela 4.1 e Figura 4.1 (coliformes totais e *E. coli*) e na Tabela 4.2 e Figura 4.2 (enterococos).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4.1 – Ocorrência de coliformes totais e *E. coli* ao longo do tempo para os três tipos de amostras de água expressos em MPN/100 mL.

Mês	Teste	Água Superficial	Água de Nascente	Água Subterrânea
Novembro 2007	Coliformes totais	2200	130	500
	<i>E. coli</i>	500	30	50
Dezembro 2007	Coliformes totais	800	500	<2
	<i>E. coli</i>	500	240	<2
Janeiro 2008	Coliformes totais	800	50	70
	<i>E. coli</i>	300	23	17
Fevereiro 2008	Coliformes totais	2400	30	7
	<i>E. coli</i>	800	23	<2
Março 2008	Coliformes totais	1100	240	<2
	<i>E. coli</i>	270	240	<2
Abril 2008	Coliformes totais	1700	—	8
	<i>E. coli</i>	130	—	<2
Maio 2008	Coliformes totais	2200	—	<2
	<i>E. coli</i>	220	—	<2
Junho 2008	Coliformes totais	2400	—	130
	<i>E. coli</i>	40	—	<2
Julho 2008	Coliformes totais	1414	579	5
	<i>E. coli</i>	76	29	<2
Agosto 2008	Coliformes totais	2420	—	16
	<i>E. coli</i>	272	—	1

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

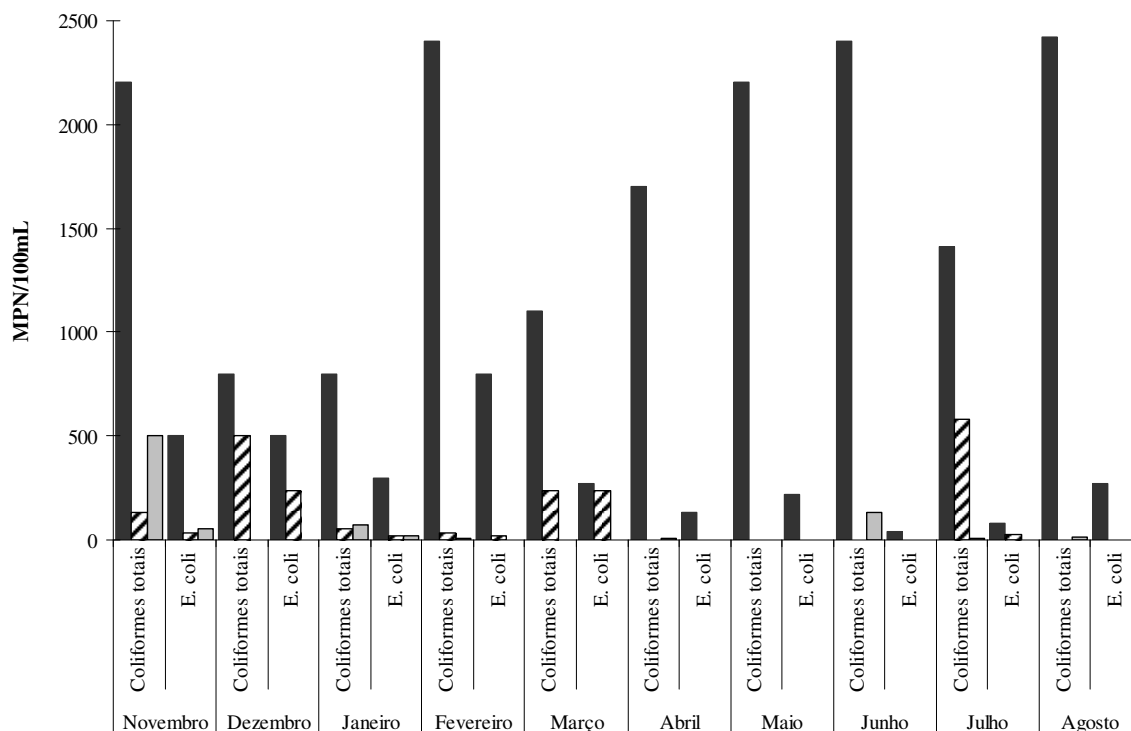


Figura 4.1 – Ocorrência (MPN/100mL) de coliformes totais e *E. coli* ao longo do tempo para os três tipos de amostras de água (■ Água Superficial; ▨ Água de Nascente; □ Água Subterrânea).

No que respeita aos resultados dos testes Colilert[®] realizados para as três matrizes não tratadas verifica-se que as amostras de água superficial apresentam, tal como esperado, em todo o período de estudo, valores superiores às restantes matrizes quer no que se refere às bactérias coliformes totais quer a *E. coli*, seguindo-se as amostras de água de nascente e por fim as amostras de água subterrânea.

De referir que os valores obtidos para a água de nascente poderão ter por base o facto de a colheita não ser realizada no ponto exacto de nascente. Se assim fosse antever-se-iam resultados mais parecidos com os obtidos para a água subterrânea, uma vez que no ponto de nascente uma água não está sujeita a qualquer tipo de contaminação fecal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.2 RESULTADOS OBTIDOS USANDO O TESTE ENTEROLERT™

Tabela 4.2 – Ocorrência de enterococos ao longo do tempo para os três tipos de amostras de água expressos em MPN/100 mL.

Mês	Teste	Água Superficial	Água de Nascente	Água Subterrânea
Fevereiro 2008	Enterococos	50	17	<2
Março 2008	Enterococos	—	—	—
Abril 2008	Enterococos	23	—	<2
Maio 2008	Enterococos	4	—	<2
Junho 2008	Enterococos	2	—	<2
Julho 2008	Enterococos	2	3	<2
Agosto 2008	Enterococos	<2	—	<2

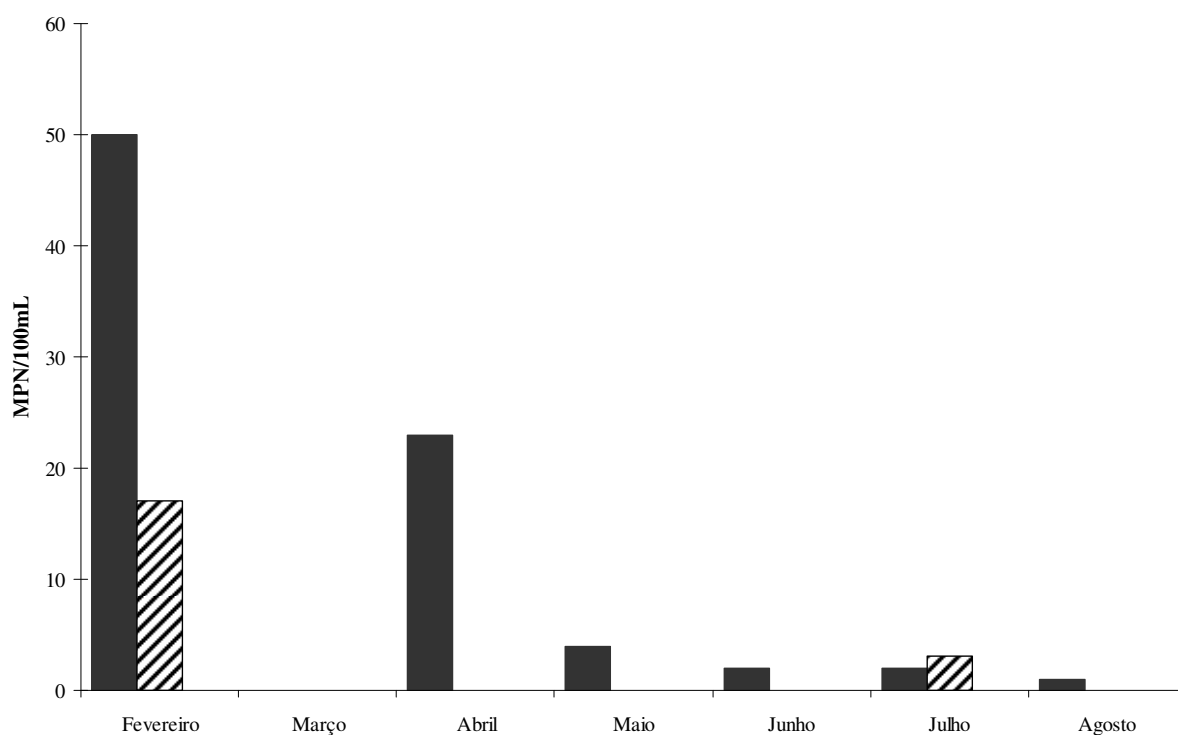


Figura 4.2 – Ocorrência (MPN/100mL) de enterococos ao longo do tempo para os três tipos de amostras de água (■ Água Superficial; ▨ Água de Nascente; □ Água Subterrânea).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No que respeita aos resultados dos testes Enterolert™ realizados para os três tipos de água verifica-se que as amostras de água superficial apresentam, ao longo do período de estudo, valores superiores às restantes matrizes no que se refere à pesquisa de enterococos, mas que vão diminuindo progressivamente.

As amostras de água subterrânea apresentam sempre valores <2, indicando que não estão sujeitas a contaminações de origem fecal.

Em relação às amostras de água de nascente, este teste apenas foi realizado nos meses de Fevereiro e Julho de 2008, tendo sido obtidos resultados muito diferentes nestes dois meses. No entanto, tal como no caso da amostra de água superficial verifica-se uma diminuição destes valores.

4.2 COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS PARA CRESCIMENTO DE FUNGOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Durante o período em estudo foi realizada a comparação de diferentes técnicas de crescimento de fungos a partir de amostras de água. Foram testadas as técnicas de filtração por membrana, espalhamento e incorporação com crescimento dos fungos em meio de cultura DRBC (por se tratar de um meio geral para o crescimento de fungos filamentosos e leveduras) para três tipos de água diferentes (água superficial, água de nascente e água subterrânea). Este estudo foi realizado em Outubro de 2007 (com o objectivo de definir qual o método a utilizar nas análises mensais), Maio e Agosto de 2008. Contudo, para a amostra de água de nascente não foi possível esta comparação devido ao facto de o posto de captação desta água estar inactivo nos meses de Maio e Agosto de 2008.

4.2.1 AMOSTRA DE ÁGUA SUPERFICIAL

Os resultados obtidos na comparação de diferentes técnicas de crescimento de fungos presentes em amostras de água superficial estão representados na Tabela 4.3 e Figura 4.3. Na Tabela 4.3 apresenta-se a quantificação dos fungos (valor médio de CFU/100mL) e o respectivo desvio padrão, bem como o número de colónias de fungos aparentemente diferentes (com base no aspecto macroscópico) obtidas em cada réplica. A Figura 4.3 representa os valores de CFU/100mL dos fungos obtidos por cada técnica de crescimento testada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4.3 – Comparação de técnicas de crescimento de fungos em amostras de água superficial (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada técnica e número de colônias diferentes por réplica realizada).

Mês	Método	Média CFU/100mL	Desvio padrão	Número de colônias diferentes				
				R1	R2	R3	R4	R5
Outubro 07	Filtração por Membrana	4167	2021	5	5	3	—	—
	Espalhamento	2750	500	2	2	0	2	3
	Incorporação	2740	371	9	7	7	10	11
Maio 08	Filtração por membrana	1850	250	14	14	21	—	—
	Espalhamento	9400	3362	7	9	7	6	5
	Incorporação	5433	929	12	9	7	0	0
Agosto 08	Filtração por membrana	1300	265	10	11	14	—	—
	Espalhamento	4750	2217	4	7	6	4	3
	Incorporação	1640	261	7	11	10	6	12

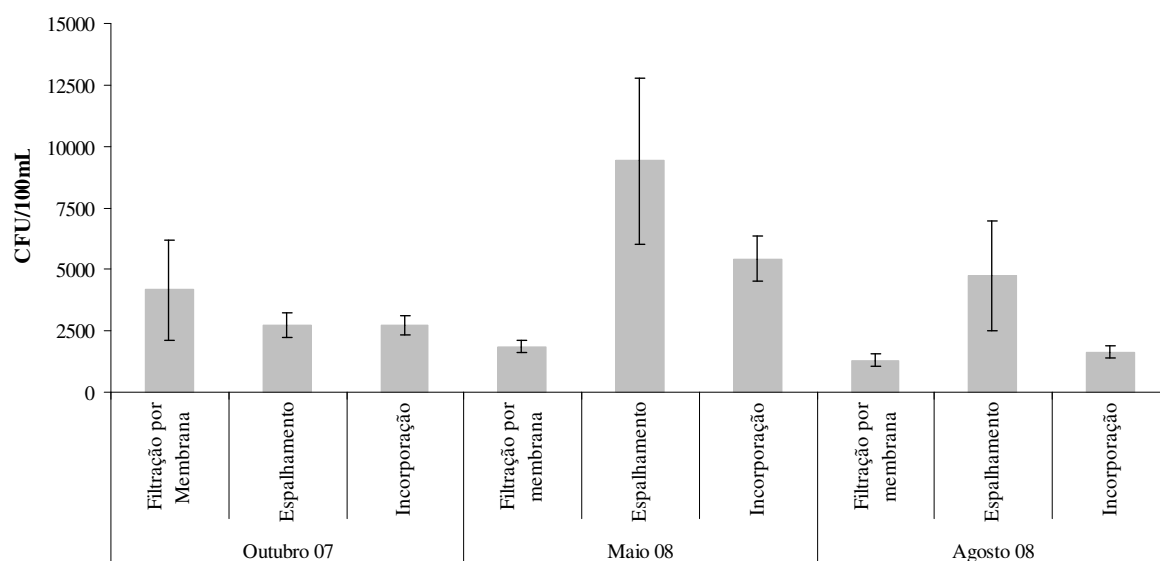


Figura 4.3 – Comparação de técnicas de crescimento de fungos em amostras de água superficial (valor médio de CFU/100mL para cada técnica).

Da observação dos dados referentes às amostras de água superficial verifica-se que os valores de CFU/100mL obtidos nos meses de Verão (Maio e Agosto de 2008) apresentam uma relação semelhante entre as três técnicas testadas, mas diferente da registrada no mês de Outubro de 2007. Esta variação poder-se-á dever às diferenças nas temperaturas e/ou

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

precipitação em diferentes épocas do ano. A relação entre o número de colônias diferentes em cada réplica realizada para as diferentes técnicas corrobora esta relação entre diferentes épocas do ano. Nos meses de Verão foi o método de filtração por membrana que permitiu uma melhor avaliação da representatividade fúngica, em termos do número de colônias observadas aparentemente diferentes, enquanto em Outubro de 2007 foi a técnica de incorporação que apresentou a melhor representatividade fúngica.

4.2.2 AMOSTRA DE ÁGUA DE NASCENTE

Os resultados obtidos da comparação de diferentes técnicas de crescimento de fungos na água de nascente estão sumarizados na Tabela 4.4 e Figura 4.4.

Tabela 4.4 – Comparação de técnicas de crescimento de fungos em amostras de água de nascente (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada técnica e número de colônias diferentes por réplica realizada).

Mês	Método	Média CFU/100mL	Desvio padrão	Número de colônias diferentes				
				R1	R2	R3	R4	R5
Outubro 07	Filtração por Membrana	3150	312	6	4	8		
	Espalhamento	1250	500	1	0	2	1	1
	Incorporação	420	110	2	4	4	3	2

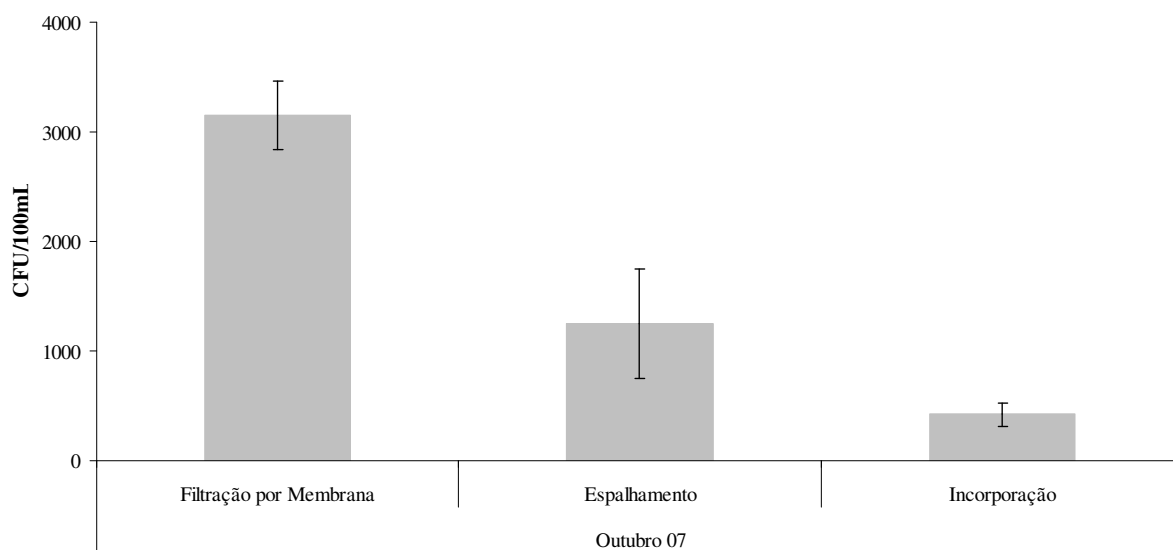


Figura 4.4 – Comparação de técnicas de crescimento de fungos em amostras de água de nascente (valor médio de CFU/100mL para cada técnica).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da observação destes dados verifica-se que a quantificação de fungos mais elevada foi obtida pelo método de filtração por membrana, sendo também este o método que apresenta os maiores valores em termos de número de colónias aparentemente diferentes em cada réplica realizada e, portanto, uma maior representatividade fúngica.

4.2.3 AMOSTRA DE ÁGUA SUBTERRÂNEA

Os resultados obtidos da comparação de diferentes técnicas de crescimento de fungos na água subterrânea estão representados na Tabela 4.5 e Figura 4.5.

Tabela 4.5 – Comparação de técnicas de crescimento de fungos em amostras de água subterrânea (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada técnica e número de colónias diferentes por réplica realizada).

Mês	Método	Média CFU/100mL	Desvio padrão	Número de colónias diferentes				
				R1	R2	R3	R4	R5
Outubro 07	Filtração por Membrana	3	1	2	3	0	—	—
	Espalhamento	<1	—	—	—	—	—	—
	Incorporação	40	0	1	0	1	0	0
Maio 08	Filtração por membrana	8	6	3	7	3	—	—
	Espalhamento	<1	—	—	—	—	—	—
	Incorporação	<1	—	—	—	—	—	—
Agosto 08	Filtração por membrana	2	1	2	1	2	—	—
	Espalhamento	<1	—	—	—	—	—	—
	Incorporação	20	0	0	0	0	0	1

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

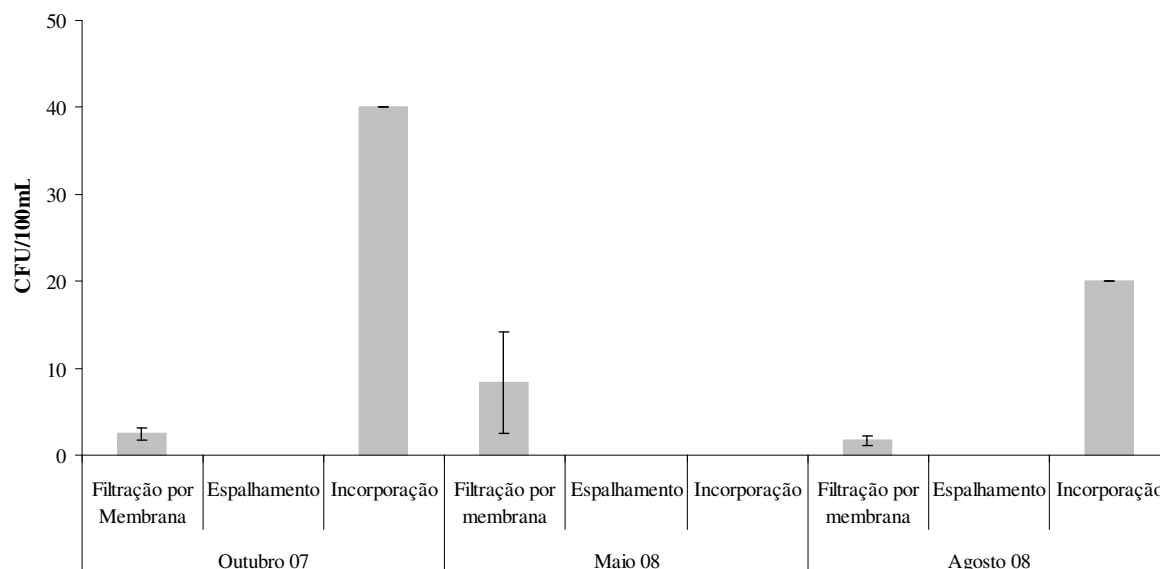


Figura 4.5 – Comparação de técnicas de crescimento de fungos em amostras de água subterrânea (valor médio de CFU/100mL para cada técnica).

As amostras de água subterrânea analisadas apresentam, de um modo geral, valores de CFU/100mL muito inferiores aos registados para amostras de água superficial ou de água de nascente. Numa situação normal seria expectável que uma água subterrânea apresentasse valores de CFU/100mL semelhantes a uma água de nascente mas diferentes de uma água superficial. Isto porque uma água superficial está muito mais exposta a contaminações ambientais e a alterações climáticas. Sucede que a colheita da água de nascente analisada não é realizada junto ao ponto de nascente mas mais adiante no curso de água, pelo que está exposta a factores externos. Este facto pode explicar que a água de nascente analisada apresente maiores semelhanças, no que respeita às quantificações de fungos realizadas, com a água superficial do que com a água subterrânea. Os pontos de captação das três águas situam-se num raio de aproximadamente 100Km, sugerindo que os factores externos a que estão sujeitas são semelhantes.

Da observação dos dados referentes às amostras de água subterrânea verifica-se que nos meses de Outubro de 2007 e Agosto de 2008 foi o método de incorporação que registou os maiores valores de quantificação de fungos, enquanto no mês de Maio de 2008 a única técnica de crescimento que permitiu o crescimento de fungos foi a filtração por membrana. Já no que se refere ao número de colónias diferentes obtidas em cada réplica, em qualquer das análises

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

foi a técnica de filtração por membrana aquela em que se observou uma melhor representatividade fúngica.

De referir ainda que a técnica de espalhamento não registou crescimentos em qualquer dos meses de análise, pelo que não será indicada para o crescimento de fungos nesta água devido à impossibilidade de quantificar valores de CFU baixos com o volume de amostra extremamente reduzido (100µL) usado nesta técnica.

Com a comparação de técnicas realizada pretendia-se a escolha de uma que pudesse ser aplicada para crescimento de fungos dos três tipos de água estudadas. Atendendo aos resultados obtidos verifica-se que a técnica de filtração por membrana será aquela que melhor se adequa ao crescimento de fungos em matrizes de águas distintas, recaindo sobre esta a escolha da técnica para prosseguir com as análises a realizar mensalmente e cujos resultados serão apresentados e discutidos mais adiante. De referir ainda que, no que respeita a análises microbiológicas de águas, esta é normalmente a técnica usada em laboratórios e referida na literatura.

4.3 COMPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA CRESCIMENTO DE FUNGOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Durante o período em estudo foram também realizados estudos comparativos de diferentes meios de cultura (DRBC, Sabouraud Dextrose Agar, Czapek-Dox Agar, DGC-18 e MEA) para os três tipos de amostras de água. Também este estudo foi realizado nos meses de Outubro de 2007, Maio de 2008 e Agosto de 2008.

4.3.1 AMOSTRA DE ÁGUA SUPERFICIAL

Em seguida apresentam-se os resultados obtidos da comparação de diferentes meios de cultura utilizados para o crescimento de fungos numa água superficial. Na Tabela 4.6 apresenta-se a quantificação dos fungos (valor médio de CFU/100mL) e o respectivo desvio padrão, bem como o número de colónias de fungos aparentemente diferentes (com base no

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

aspecto macroscópico) obtidas em cada réplica. A Figura 4.6 representa os valores de CFU/100mL dos fungos obtidos em diferentes meios de cultura.

Tabela 4.6 – Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos em amostras de água superficial (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura e número de colônias diferentes por réplica realizada).

Mês	Meio de Cultura	Média CFU / 100ml	Desvio padrão	Número de colônias diferentes		
				R1	R2	R3
Outubro 07	DRBC	4167	2021	5	5	3
	Sabouraud	2667	1528	8	2	6
	Czapek	1833	1155	1	2	3
	DGC-18	1550	265	8	11	9
	MEA	1833	289	1	4	3
Maio 08	DRBC	1850	250	14	14	21
	Sabouraud	1217	144	22	17	14
	Czapek	<1	—	—	—	—
	DGC-18	1333	325	18	18	15
	MEA	967	404	9	6	12
Agosto 08	DRBC	1300	265	10	11	14
	Sabouraud	750	306	7	12	8
	Czapek	<1	—	—	—	—
	DGC-18	1433	416	14	8	8
	MEA	900	100	7	8	7

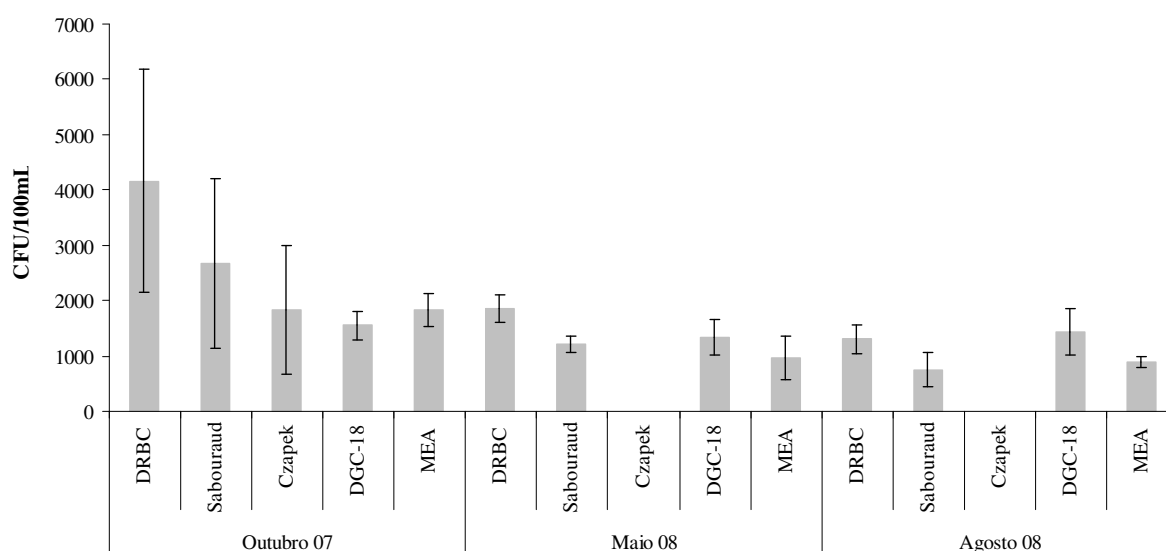


Figura 4.6 – Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos em amostras de água superficial (valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da observação dos dados referentes às amostras de água superficial verifica-se que os valores de CFU/100mL obtidos nos meses de Verão (Maio e Agosto de 2008) são, analisando cada meio de cultura individualmente, inferiores aos registados em Outubro de 2007.

Em Outubro de 2007 o maior valor de CFU/100mL corresponde ao meio DRBC seguindo-se o meio Sabouraud Dextrose Agar. Este resultado poderia indicar uma maior presença de fungos potencialmente patogénicos, nomeadamente fungos dermatófitos, na água superficial no mês de Outubro de 2007. No entanto os fungos dermatófitos encontram-se, normalmente, em ambientes húmidos e quentes, pelo que os valores de CFU/100mL registados não serão, provavelmente, devidos à presença de dermatófitos mas de outros grupos de fungos.

No que respeita à representatividade fúngica, os meios de cultura DRBC, Sabouraud e DGC-18 são os que apresentam um maior número de colónias diferentes em cada réplica.

4.3.2 AMOSTRA DE ÁGUA DE NASCENTE

Os resultados obtidos da comparação de diferentes meios de cultura para crescimento de fungos na água de nascente estão sumarizados na Tabela 4.7 e Figura 4.7.

Tabela 4.7 – Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos em amostras de água de nascente (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura e número de colónias diferentes por réplica realizada).

Mês	Meio de Cultura	Média CFU / 100ml	Desvio padrão	Número de colónias diferentes		
				R1	R2	R3
Outubro 07	DRBC	3150	312	6	4	8
	Sabouraud	783	202	5	6	4
	Czapek	<1	—	—	—	—
	DGC-18	1100	132	4	5	4
	MEA	500	132	6	3	3

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

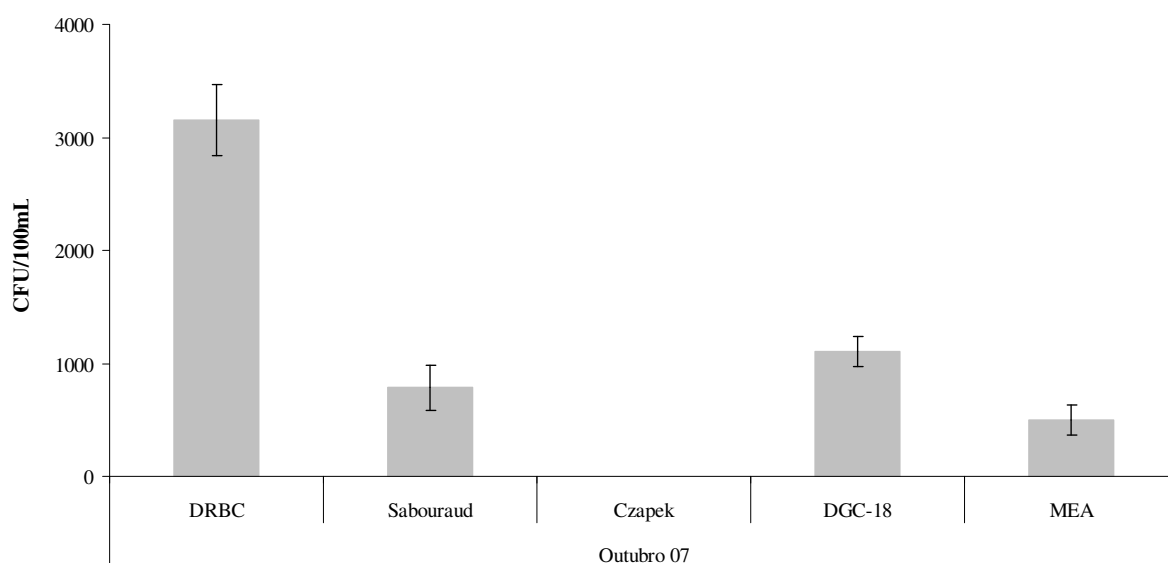


Figura 4.7 – Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos em amostras de água de nascente (valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura).

Na análise realizada em diferentes meios de cultura à água de nascente verifica-se que o meio de cultura DRBC apresenta valores de quantificação de fungos muito superiores aos registados para os outros meios de cultura. No que respeita à representatividade todos os meios (excepto o Czapek-Dox Agar que não apresentou crescimento fúngico em qualquer réplica) apresentam valores semelhantes relativamente ao número de colónias diferentes em cada réplica.

4.3.3 AMOSTRA DE ÁGUA SUBTERRÂNEA

Os resultados obtidos da comparação de diferentes meios de cultura para crescimento de fungos na água subterrânea estão sumarizados na Tabela 4.8 e Figura 4.8.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4.8 – Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos em amostras de água subterrânea (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura e número de colônias diferentes por réplica realizada).

Mês	Meio de Cultura	Média CFU / 100ml	Desvio padrão	Número de colônias diferentes		
				R1	R2	R3
Outubro 07	DRBC	3	1	2	3	0
	Sabouraud	18	7	5	4	6
	Czapek	<1				
	DGC-18	8	1	4	4	4
	MEA	4	2	1	3	4
Maio 08	DRBC	8	6	3	7	3
	Sabouraud	2	1	3	2	1
	Czapek	<1				
	DGC-18	3	1	3	2	0
	MEA	3	2	1	5	4
Agosto 08	DRBC	2	1	2	1	2
	Sabouraud	3	2	4	5	4
	Czapek	<1				
	DGC-18	2	1	1	3	2
	MEA	6	3	6	5	2

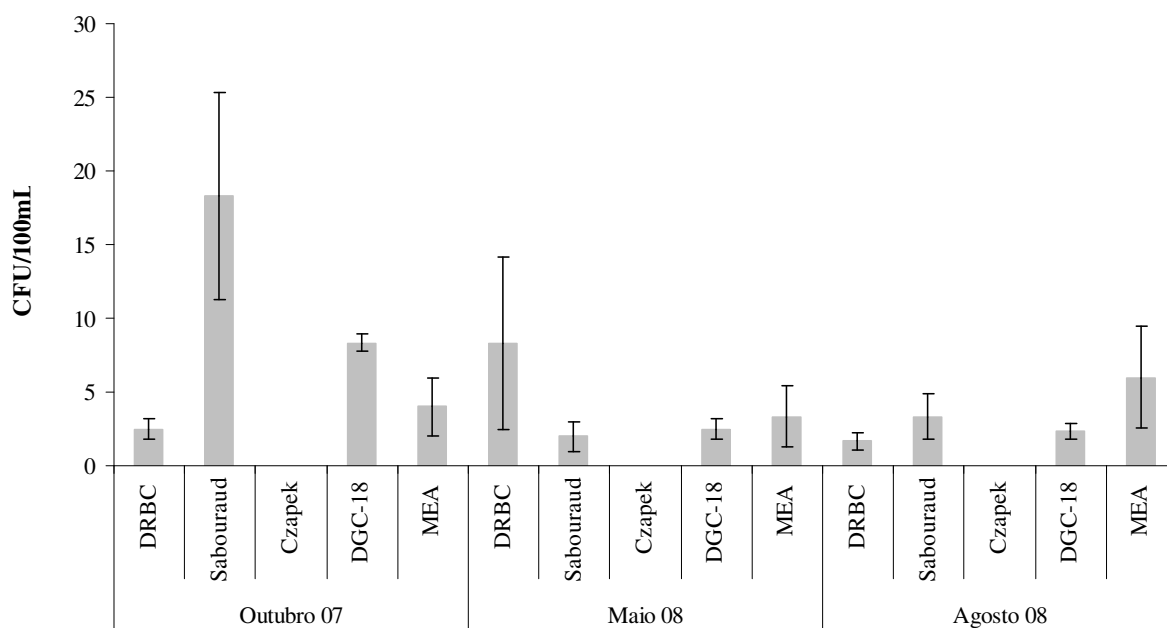


Figura 4.8 – Comparação de meios de cultura para crescimento de fungos em amostras de água subterrânea (valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de água subterrânea analisadas apresentam, como já foi referido, valores de CFU/100mL muito inferiores aos registados para amostras de água superficial ou de água de nascente, como seria de esperar.

A análise das amostras de água subterrânea em meio de cultura Czapek-Dox Agar não permitiu o crescimento de fungos filamentosos nem de leveduras em nenhum dos meses em análise, pelo que não parece ser indicado para o crescimento de fungos presentes nesta água.

Relativamente à quantificação dos fungos nos diferentes meios de cultura verifica-se que, de um modo geral, o mês de Outubro de 2007 apresenta contagens superiores às registadas nos meses de Verão (Maio e Agosto de 2008). Por outro lado, não se destaca um meio de cultura que apresente valores mais elevados de CFU/100mL nos três meses em que foi realizado este estudo.

Relativamente à representatividade fúngica nos diferentes meios de cultura verifica-se que as contagens de colónias diferentes em cada réplica e para cada meio de cultura são semelhantes entre todos os meios onde ocorreu crescimento.

Com a comparação de diferentes meios de cultura para crescimento de fungos pretendia-se seleccionar um que permitisse uma boa quantificação dos fungos presentes, mas que fornecesse também uma boa representatividade da população de fungos presentes em cada uma das águas analisadas. Assim, atendendo aos dados apresentados e à necessidade de escolha de um meio de cultura geral, considerou-se que o meio de cultura DRBC seria adequado para prosseguir com as análises a realizar mensalmente às três amostras de água, apesar de os resultados para a água subterrânea não darem indicação de um meio de cultura preferencial.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4 COMPARAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS NA ANÁLISE DOS PERFIS DAS POPULAÇÕES DE FUNGOS POR DGGE

Uma vez realizada a comparação de diferentes técnicas para crescimento e quantificação (CFU/100mL) de fungos presentes em amostras de água procedeu-se à análise das mesmas amostras por técnicas de biologia molecular. Para tal foi realizada a extracção do DNA de fungos presentes numa placa resultante do crescimento de fungos por cada uma das técnicas e também da membrana conservada a -20°C após filtração, para cada amostra de água, resultantes dos ensaios realizados em Outubro de 2007 (quantificação do DNA extraído no Anexo A11) que foi posteriormente submetido a amplificação por PCR da região ITS. A eficiência da extracção de DNA bem como a ocorrência de amplificação por PCR foram confirmadas por electroforese em gel de agarose. No caso da confirmação da eficiência da extracção de DNA deve obter-se uma banda na zona de início da corrida, uma vez que o peso molecular elevado da cadeia dupla de DNA impede a sua migração ao longo do gel; para a confirmação da ocorrência de amplificação por PCR da região ITS deve obter-se uma só banda (no caso de isolados) ou várias bandas com 500 a 800 bp ^[26].

O DNA da mistura, uma vez amplificado é sujeito a uma electroforese em DGGE, sendo os géis obtidos apresentados no Anexo A12. A comparação dos perfis das bandas obtidas foi efectuada pelo método de agregação denominado **UPGMA** (Unweighted Pair-Group Method Average) usando o coeficiente de correlação de Pearson, no *software* BioNumerics®, para traçado dos dendogramas dos perfis das populações de fungos presentes em cada amostra.



Figura 4.9 – Comparação de perfis de DGGE das populações de fungos presentes em amostras de água resultantes da aplicação de diferentes técnicas para crescimento de fungos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis no dendograma acima apresentado possuem três variáveis: diferentes tipos de águas, diferentes técnicas de crescimento de fungos e diferentes métodos de extracção de DNA. Verifica-se, ainda assim, a formação de dois *clusters*.

Um dos *clusters* apresenta apenas os perfis obtidos para a amostra de água de nascente, verificando-se ainda que o perfil da população presente na membrana que não foi sujeita a incubação e onde, portanto, não houve crescimento fúngico – FM (sem crescimento) – apresenta uma divergência considerável quando comparado com os perfis obtidos da aplicação das diferentes técnicas para esta mesma água. Este resultado sugere uma possível perda de informação relativamente à população total de fungos presentes nesta água por crescimento em meio de cultura.

Os perfis obtidos para as amostras de água superficial e subterrânea não permitem a separação expectável entre as duas águas nem equacionar uma possível relação entre as diferentes técnicas aplicadas à análise destas matrizes. De notar que, no entanto, para a água subterrânea o grau de similaridade entre a população obtida após filtração por membrana com crescimento em DRBC e a população obtida após filtração por membrana mas sem crescimento em meio de cultura – FM (sem crescimento) – é superior a 50%.

4.5 COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA ANÁLISE DOS PERFIS DAS POPULAÇÕES DE FUNGOS POR DGGE

Tal como foi realizado para as diferentes técnicas de crescimento de fungos presentes em amostras de água, também para os diferentes meios de cultura testados se procedeu à extracção do DNA dos fungos presentes numa placa de cada meio de cultura, para cada amostra de água, resultantes dos ensaios realizados em Outubro de 2007 (quantificação do DNA extraído no Anexo A11) que foi posteriormente submetido a amplificação por PCR da região ITS. A eficiência da extracção de DNA bem como a ocorrência de amplificação por PCR foram confirmadas por electroforese em gel de agarose.

Também neste caso o DNA das misturas foi sujeito a uma electroforese em DGGE (ver géis no Anexo A12). A comparação dos perfis das bandas obtidas foi efectuada pelo método de agregação denominado **UPGMA** usando o coeficiente de correlação de Pearson, no *software* BioNumerics®, para traçado dos dendogramas dos perfis das populações de fungos presentes em cada uma das amostras resultantes do crescimento fúngico em diferentes meios

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

de cultura bem como os perfis das populações resultantes das membranas conservadas a -20°C (sem crescimento fúngico) após filtração.

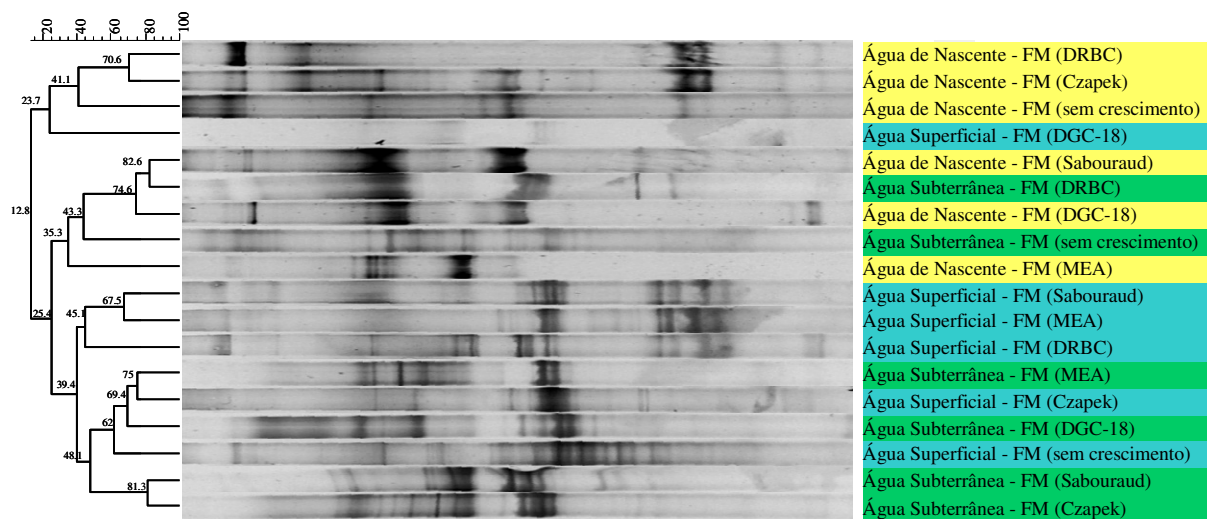


Figura 4.10 – Comparação de perfis de DGGE das populações de fungos presentes em amostras de água resultantes da utilização de diferentes meios de cultura para crescimento de fungos.

Também neste caso, o dendrograma apresentado apresenta três parâmetros variáveis: diferentes tipos de águas, diferentes meios de cultura para crescimento de fungos e diferentes métodos de extracção de DNA.

A observação do dendrograma acima apresentado não sugere uma relação entre os perfis das populações de fungos isolados de cada um dos diferentes meios de cultura testados, ou seja, para os diferentes tipos de água não se verifica uma homogeneidade nas populações de fungos presentes em cada meio de cultura. Estes resultados são a confirmação da especificidade de cada meio de cultura utilizado e testado para estas águas, sendo o crescimento fúngico diferente dos obtidos nos restantes meios de cultura.

Verifica-se, conforme esperado, que os perfis para a filtração por membrana sem crescimento apresentam um maior número de bandas relativamente aos perfis dos diferentes meios de cultura. Os meios de cultura que apresentam, de um modo geral, mais bandas coincidentes com algumas das bandas observadas nos perfis das filtrações sem crescimento foram o Czapek-Dox Agar e o DRBC, o que coincide com o facto de se tratarem de meios gerais. Este facto justifica, em parte, a escolha do meio DRBC para o crescimento de fungos nas diferentes águas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.6 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE FUNGOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA AO LONGO DO TEMPO

O desenvolvimento deste trabalho durante 11 meses consecutivos levou a uma avaliação da variação de ocorrência de fungos ao longo do tempo nos três tipos de água. Considerando os estudos anteriores, foi definido que esta evolução seria estudada usando o método de filtração por membrana com crescimento dos fungos em meio de cultura DRBC.

4.6.1 AMOSTRA DE ÁGUA SUPERFICIAL

Em seguida apresentam-se os resultados de ocorrência de fungos ao longo do tempo numa água superficial. Na Tabela 4.9 apresenta-se a quantificação dos fungos (valor médio de CFU/100mL) e o respectivo desvio padrão, bem como o número de colônias de fungos aparentemente diferentes (com base no aspecto macroscópico) obtidos em cada réplica. A Figura 4.11 representa os valores de CFU/100mL dos fungos obtidos ao longo do tempo.

Tabela 4.9 – Ocorrência de fungos ao longo do tempo em água superficial (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura e número de colônias diferentes por réplica realizada).

Mês de análise	Média CFU / 100ml	Desvio padrão	Número de colônias diferentes		
			R1	R2	R3
Outubro 2007	4167	2021	5	5	3
Novembro 2007	900	0	1	6	6
Dezembro 2007	27	12	2	4	2
Janeiro 2008	2700	566	—	—	—
Fevereiro 2008	517	144	—	—	—
Março 2008	1250	397	—	—	—
Abril 2008	450	71	—	—	—
Maio 2008	1850	250	14	14	21
Junho 2008	983	202	14	17	12
Julho 2008	1467	115	9	10	9
Agosto 2008	1300	265	10	11	14

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

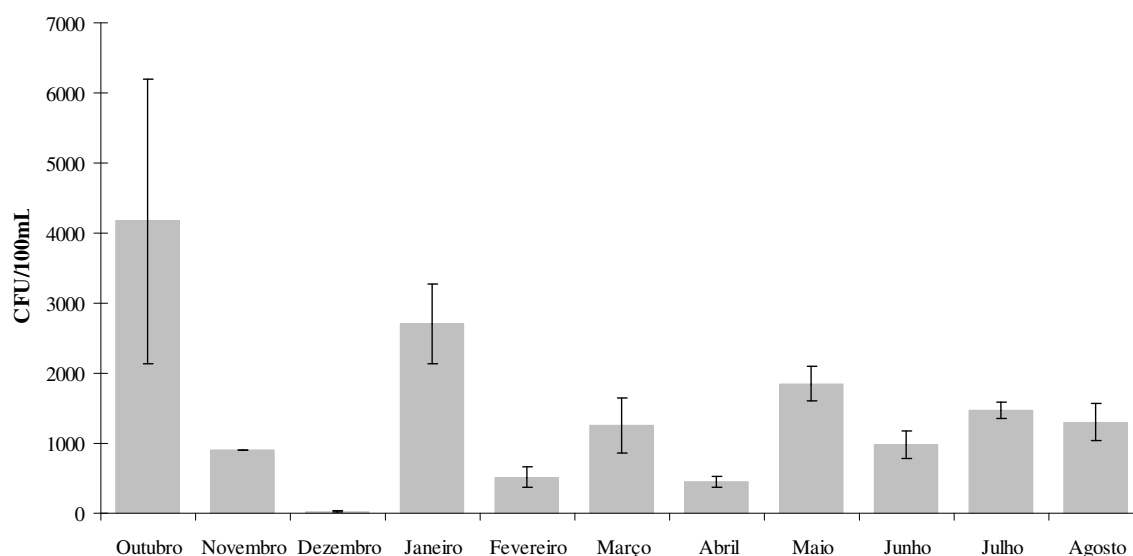


Figura 4.11 – Ocorrência de fungos ao longo do tempo em água superficial (valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura).

Pela análise do gráfico acima apresentado verifica-se que a ocorrência de fungos durante os meses de Outono / Inverno (entre Outubro de 2007 e Fevereiro de 2008) é mais variável que nos meses de Primavera / Verão (entre Março e Agosto de 2008). Observa-se ainda que foi nos meses de Outubro e Dezembro de 2007 que se registaram, respectivamente, o maior e menor valores de CFU/100mL obtidos durante todo o período em estudo.

No que respeita à representatividade dos fungos presentes nas diferentes réplicas, não houve registo destes dados entre Janeiro e Abril de 2008. No entanto, observando os dados registados, verifica-se uma maior representatividade fúngica nos meses de Verão relativamente aos de Outono/Inverno.

4.6.2 AMOSTRA DE ÁGUA DE NASCENTE

Os resultados de ocorrência de fungos ao longo do tempo em água de nascente estão sumarizados na Tabela 4.10 e Figura 4.12.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4.10 – Ocorrência de fungos ao longo do tempo em água de nascente (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura e número de colônias diferentes por réplica realizada).

Mês de análise	Média CFU / 100ml	Desvio padrão	Número de colônias diferentes		
			R1	R2	R3
Outubro 2007	3150	312	6	4	8
Novembro 2007	100	40	5	6	5
Dezembro 2007	40	17	6	2	3
Janeiro 2008	600	265	—	—	—
Fevereiro 2008	1000	50	—	—	—
Março 2008	2275	177	—	—	—
Abril 2008	—	—	—	—	—
Maio 2008	—	—	—	—	—
Junho 2008	100	0	1	1	1
Julho 2008	533	115	3	1	3
Agosto 2008	—	—	—	—	—

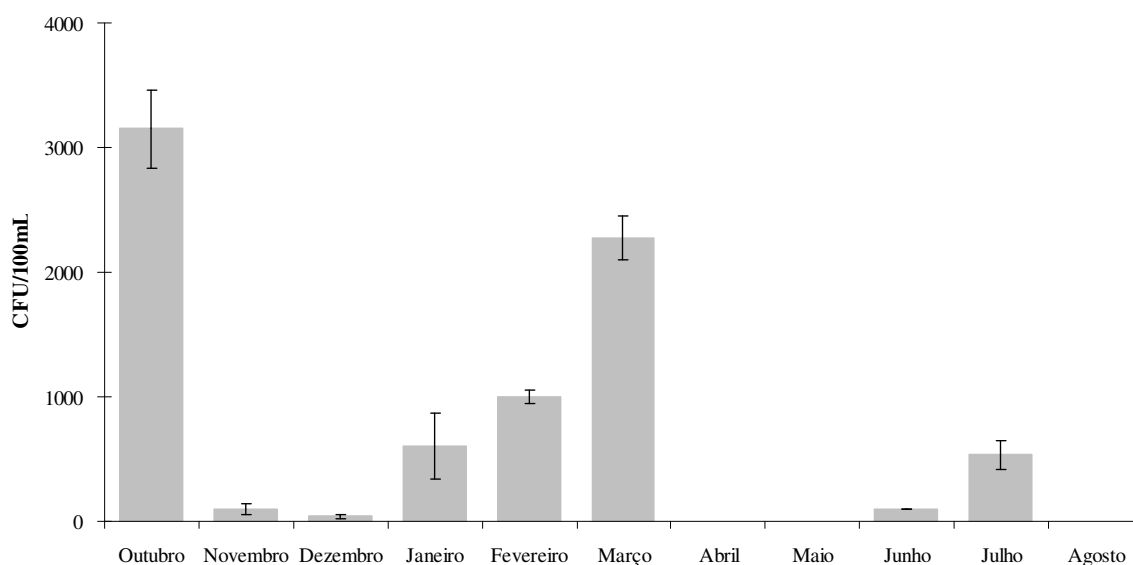


Figura 4.12 – Ocorrência de fungos ao longo do tempo em água de nascente (valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura).

Para a água de nascente não foram realizados ensaios nos meses de Abril, Maio e Agosto de 2008. Os valores de CFU/100mL registrados nos meses de Outono / Inverno, com exceção de Outubro de 2007, registam um aumento relativamente gradual da ocorrência de fungos nesta água. Verifica-se ainda que tal como registado para a água superficial, foi nos

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

meses de Outubro e Dezembro de 2007 que se registaram, respectivamente, o maior e menor valores de CFU/100mL obtidos durante todo o período em estudo.

Nos meses de Verão em que foi novamente realizada análise desta água verifica-se que os valores de CFU/100mL registados são muito inferiores aos registados no último mês anterior (Março de 2008). Como não há um registo intermédio não será possível compreender como decorreu esta diminuição no que respeita às populações de fungos presentes.

No que respeita à representatividade de fungos presentes nas diferentes réplicas, não houve registo destes dados entre Janeiro e Março de 2008. No entanto, observando os dados registados, verifica-se uma maior representatividade fúngica nos meses de Outono relativamente aos de Verão, contrariamente ao que se verificou na análise da água superficial.

4.6.3 AMOSTRA DE ÁGUA SUBTERRÂNEA

Os resultados de ocorrência de fungos ao longo do tempo em água subterrânea estão sumarizados na Tabela 4.11 e Figura 4.13.

Tabela 4.11 – Ocorrência de fungos ao longo do tempo em água subterrânea (quantificação em valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura e número de colónias diferentes por réplica realizada).

Mês de análise	Média CFU / 100ml	Desvio padrão	Número de colónias diferentes		
			R1	R2	R3
Outubro 2007	3	1	2	3	0
Novembro 2007	2	1	1	3	2
Dezembro 2007	1	0	1	2	1
Janeiro 2008	24	2	—	—	—
Fevereiro 2008	27	6	—	—	—
Março 2008	40	5	—	—	—
Abril 2008	97	40	—	—	—
Maio 2008	8	6	3	7	3
Junho 2008	5	4	0	4	2
Julho 2008	43	12	3	1	2
Agosto 2008	2	1	2	1	2

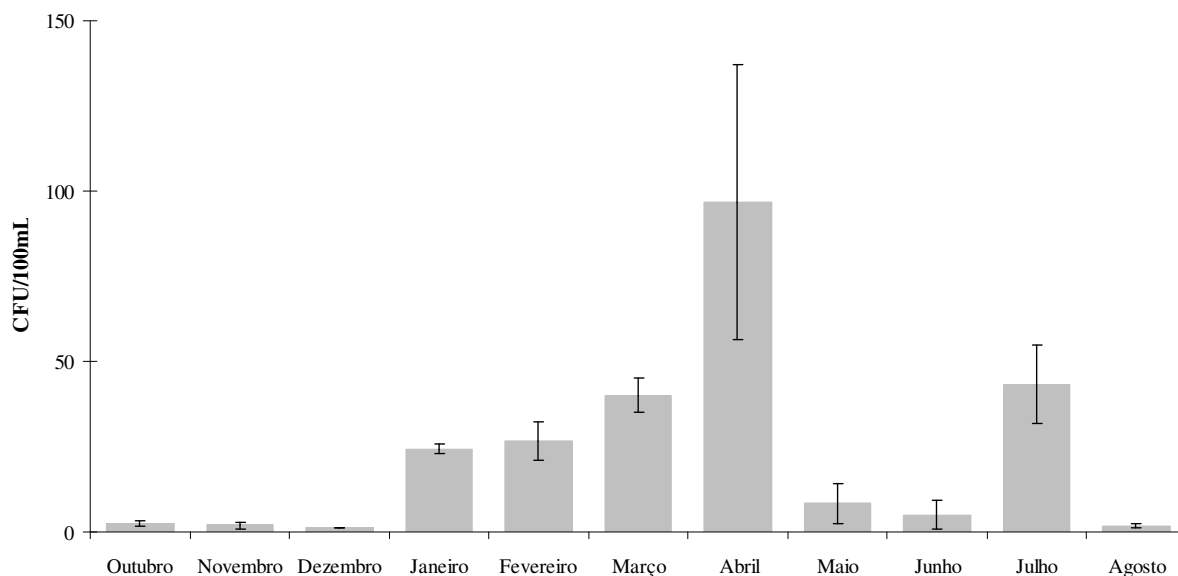


Figura 4.13 – Ocorrência de fungos ao longo do tempo em água subterrânea (valor médio de CFU/100mL para cada meio de cultura).

Os valores de ocorrência de fungos ao longo do tempo para a água subterrânea são muito inferiores aos registados para as águas superficial e de nascente, evidenciando as diferenças de exposição a factores externos já referida.

Para esta água os valores mais baixos de ocorrência de fungos registaram-se nos meses de Outono (entre Outubro e Dezembro de 2007), aumentando gradualmente – até ao valor máximo obtido para esta água – nos meses de Inverno / Primavera (entre Janeiro e Abril de 2008) e voltando a diminuir com no início do Verão.

No que respeita à representatividade de fungos presentes nas diferentes réplicas, não houve registo destes dados entre Janeiro e Abril de 2008. No entanto, observando os dados registados, não se verificam diferenças significativas de representatividade fúngica comparando os meses de Verão com os de Outono / Inverno.

Com a avaliação da ocorrência de fungos nos diferentes tipos de água ao longo do tempo pretendia-se compreender até que ponto esta poderia ser influenciada pelas alterações sazonais (nomeadamente no que concerne a temperatura e precipitação). No caso das águas superficial e de nascente algumas das variações registadas poderão ter por base alterações climáticas. Contudo, convém não esquecer que, em qualquer das águas estudadas pode

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

haver alterações resultantes de actividade humana, como a agricultura ou a existência de zonas fabris nas proximidades de cursos de água.

Os resultados obtidos da comparação entre os dados mensais de temperatura do ar e precipitação para a região de proviniência das diferentes amostras de água ^[35] e os dados de ocorrência de fungos obtidos para cada tipo de água (ver Anexo A13) mostram que não existe uma relação linear entre estes parâmetros, pelo que as variações de ocorrência de fungos não deverão estar relacionadas com alterações climáticas.

Foi ainda realizada a comparação dos resultados de ocorrência ao longo do tempo de bactérias indicadoras de contaminação fecal e de fungos, para cada tipo de água (ver Anexo A14. Neste caso, também não é possível estabelecer qualquer tipo de relação entre a ocorrência destes dois grupos de microrganismos.

4.7 COMPARAÇÃO DOS PERFIS DAS POPULAÇÕES DE FUNGOS AO LONGO DO TEMPO POR DGGE

Com o objectivo de comparar os perfis das populações de fungos isolados, ao longo do tempo, das três matrizes de água estudadas, foi realizada a extracção do DNA de fungos presentes numa placa resultante dos ensaios realizados mensalmente (técnica de filtração por membrana com crescimento fúngico em meio de cultura DRBC) para cada amostra de água. Os procedimentos de extracção de DNA, amplificação por PCR da região ITS e electroforese em DGGE foram realizados tal como referido no capítulo 4.4. A comparação dos perfis de bandas obtidas a partir dos géis de DGGE (apresentados no Anexo A12) foi efectuada pelo método de agregação **UPGMA** usando o coeficiente de correlação de Pearson, no *software* BioNumerics[®]. Desta comparação resultou o dendograma apresentado na figura 4.14.

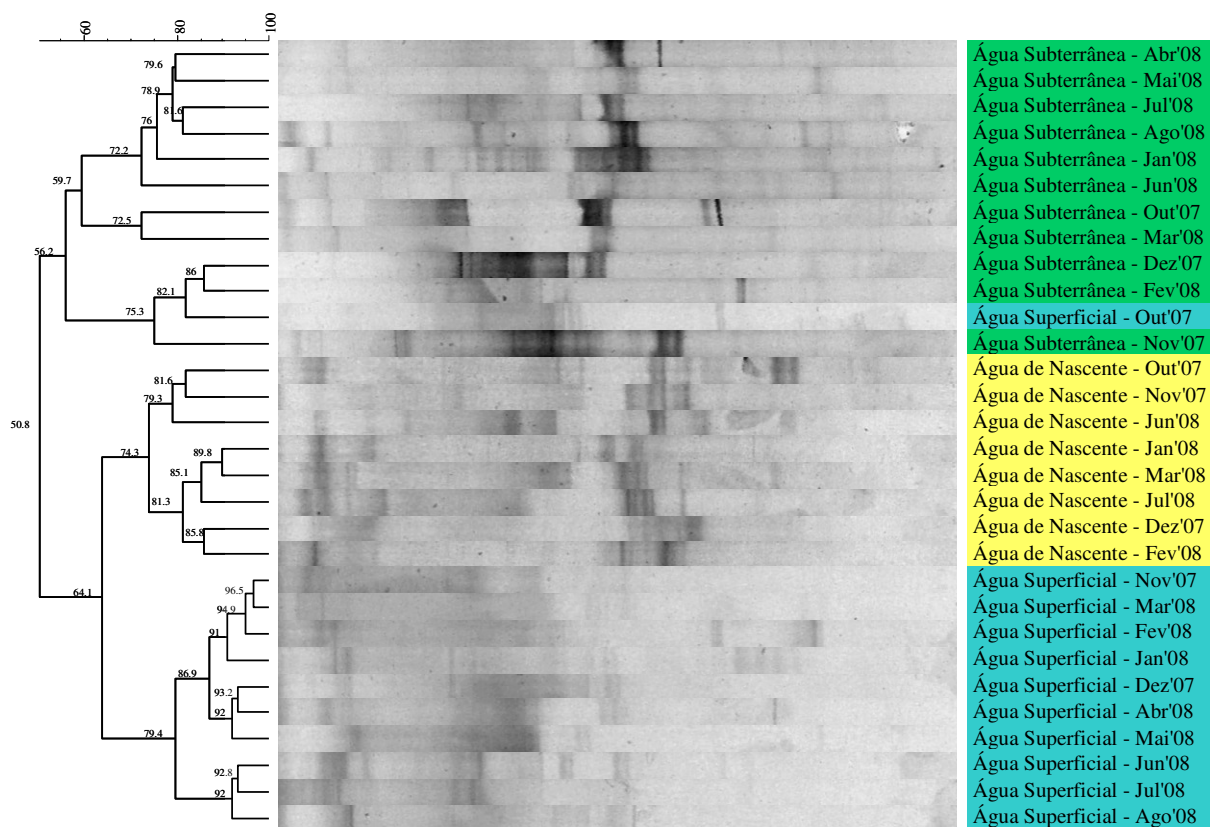


Figura 4.14 – Comparação dos perfis de DGGE das populações de fungos presentes nos três tipos de água ao longo do tempo (amostras obtidas pela técnica de filtração por membrana com crescimento em meio de cultura DRBC).

Do dendrograma acima apresentado verifica-se que os perfis obtidos originaram a formação de três *clusters*, correspondendo cada um às diferentes matrizes de água analisadas, o que indica que nas diferentes matrizes deverão estar presentes algumas espécies diferentes. Exceptua-se a amostra de água superficial referente ao mês de Outubro de 2007 que apresenta uma maior similaridade com as amostras de água subterrânea do que com as restantes amostras de água superficial.

Os perfis obtidos revelam uma maior similaridade entre os *clusters* correspondentes às amostras de água superficial e de nascente, o que poderá significar que uma possível exposição a factores externos semelhantes permite o crescimento dos mesmos géneros de fungos.

A análise dos perfis das populações de fungos presentes nas amostras de água superficial revela uma associação entre algumas amostras analisadas em meses consecutivos (veja-se, por exemplo, os meses de Junho, Julho e Agosto de 2008). Estas associações sugerem uma possível alteração gradual, ao longo do tempo, das populações de fungos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No caso dos perfis obtidos para as amostras de água de nascente e subterrânea, associações como as acima referidas são menos frequentes. Contudo, no caso dos perfis obtidos da análise das amostras de água subterrânea verifica-se uma maior similaridade entre os correspondentes às análises nos meses de Primavera / Verão (entre Abril e Agosto de 2008).

4.8 FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS IDENTIFICADOS

As identificações que a seguir se apresentam resultam de uma selecção de isolados, não representando a totalidade das populações presentes em cada uma das águas. Os fungos a identificar foram seleccionados atendendo ao seu diferente aspecto macroscópico, visando a identificação de grupos diferentes de entre os presentes em cada tipo de água.

Os fungos filamentosos foram identificados com base nas características macroscópicas das colónias isoladas conjuntamente com as observações microscópicas das estruturas de frutificação dos fungos isolados (no Anexo A15 encontram-se as características e fotografias dos fungos filamentosos identificados). No caso das leveduras a identificação foi realizada recorrendo a galerias API ID 32 C (BioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, France).

Apresenta-se em seguida os resultados das identificações dos fungos filamentosos e das leveduras que foram isolados das amostras de água estudadas, bem como as quantidades detectadas (em CFU/100mL) nas amostras de onde foram isolados. Em casos em que o mesmo fungo tenha sido isolado de mais do que uma placa será apresentado o intervalo de valores de ocorrência registados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4.12 – Exemplos de fungos filamentosos e leveduras isolados e identificados das três amostras de água e respectivos valores de ocorrência registrados.

Tipo de água	Fungos filamentosos	CFU/100mL	Leveduras	CFU/100mL
Água Superficial	<i>Aspergillus</i> cf. <i>fumigatus</i>	0.05 - 0.10	<i>Cryptococcus albidus</i>	100
	<i>Aspergillus</i> cf. <i>niger</i>	50	<i>Cryptococcus laurentii</i>	100 - 500
	<i>Cladosporium</i> cf. <i>cladosporioides</i>	0.20	<i>Rhodotorula glutinis</i>	0.40 - 100
	<i>Fusarium</i> sp.	0.10 - 7	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0.40
	<i>Penicillium</i> cf. <i>oxalicum</i>	500		
	<i>Trichoderma</i> sp.	0.20		
Água de Nascente	<i>Acremonium</i> sp.	1	<i>Candida globosa</i>	1000
	<i>Alternaria</i> cf. <i>alternata</i>	0.20 - 0.60	<i>Candida rugosa</i>	450
	cf. <i>Beauveria</i> sp.	20	<i>Candida sake</i>	100 - 1000
	<i>Cladosporium</i> cf. <i>cladosporioides</i>	20	<i>Candida silvicola</i>	10
	<i>Cladosporium</i> cf. <i>macrocarpum</i>	0.20 - 20	<i>Cryptococcus neoformans</i>	10
	<i>Fusarium</i> sp.	0.10	<i>Rhodotorula minuta</i>	50
	<i>Penicillium</i> cf. <i>chrysogenum</i>	0.05	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1
	<i>Scopulariopsis</i> sp.	0.20	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
Água Subterrânea	<i>Aspergillus</i> cf. <i>ustus</i>	0.05	<i>Candida holmii</i>	0.40
	cf. <i>Beauveria</i> sp.	0.20	<i>Candida valida</i>	0.20
	<i>Cladosporium</i> cf. <i>cladosporioides</i>	0.20 - 20	<i>Kloeckera apis/apiculata</i>	20
	<i>Fusarium</i> sp.	0.10 - 50	<i>Kloeckera japonica</i>	50
	<i>Stachybotrys</i> sp.	0.8	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	50 - 500
	<i>Trichoderma</i> sp.	0.3	<i>Zygosaccharomyces</i> spp.	20

Todos os fungos filamentosos e leveduras que foram identificados se encontram vastamente distribuídos na natureza, sendo muitos deles encontrados frequentemente em águas mas também no solo e no ar.

Os fungos apresentados na tabela acima representam a diversidade das populações em cada tipo de água estudada, verificando-se que, apesar de alguns fungos identificados se terem encontrado nos três tipos, outros há que apenas foram identificados numa água.

Os resultados das identificações apenas dão uma indicação da variabilidade das populações de fungos presentes em cada uma das águas, não havendo relação entre o número de fungos identificados e o número de fungos presentes em cada água.

Os fungos filamentosos identificados pertencem ao *phylum* Ascomycota, enquanto as leveduras identificadas pertencem a dois *phyla*: Ascomycota e Basidiomycota.

Os resultados obtidos permitem concluir que as técnicas de crescimento aplicadas aos três tipos de águas estudadas permitem o isolamento predominante de fungos pertencentes ao *phylum* Ascomycota. No entanto convém ter em conta que se tratam de técnicas de crescimento em placa sendo, portanto, necessário não esquecer que se poderá perder informação decorrente da eventual presença de fungos não cultiváveis nestas águas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de ser normal encontrar os fungos acima referidos em águas e de, numa situação normal, estes não afectarem a vida diária dos seres humanos, algumas situações e ambientes podem despoletar a patogenicidade destes fungos.

Os fungos filamentosos encontrados nas diferentes águas analisadas apresentam um reduzido potencial patogénico para o Homem, excepto em casos de indivíduos imunocomprometidos, uma vez que na sua maioria se tratam de fungos oportunistas. Fungos pertencentes ao género *Stachybotrys* sp. estão referenciados pela produção de micotoxinas; o género *Aspergillus* sp. está associado à aspergilose; dos fungos dos géneros *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. ou *Scopulariopsis* sp. há registos de infecções da pele. Também algumas das leveduras identificadas estão descritas como potenciais patogénicos para o Homem, sendo talvez mais referenciadas leveduras do género *Candida* sp. pelas micoses (candidíase) que pode provocar, principalmente em indivíduos portadores do vírus HIV. Das leveduras *Rhodotorula* sp. e *Cryptococcus* sp. há registos de infecções em indivíduos imunocomprometidos ^[36].

5 CONCLUSÕES

A água é um bem essencial ao Homem. Mas é também o habitat de numerosos organismos, entre os quais se incluem fungos e bactérias, alguns deles com potencial patogénico para o Homem, outros animais e plantas. Deste facto resulta a necessidade de investigar que tipos de fungos e bactérias podemos encontrar em águas de composição distinta e, dependendo destes resultados, que utilizações podemos dar à água (tais como consumo humano, banhos e rega).

O presente trabalho insere-se num projecto de estudo de métodos de tratamento de águas para consumo humano e teve como objectivos principais avaliar a presença de fungos e bactérias em águas não tratadas optimizando simultaneamente técnicas a usar ao longo do projecto.

Dos ensaios realizados mensalmente fez parte a identificação e quantificação de bactérias indicadoras de contaminações de origem fecal, ou seja, coliformes totais, *E. coli* e enterococos.

Numa outra fase foram testadas diferentes técnicas e meios de cultura para o crescimento de fungos presentes em amostras de água. Com este estudo pretendia-se definir qual a melhor solução para a detecção de fungos em três matrizes de água diferentes (água superficial, água de nascente e água subterrânea). Estes testes de comparação de técnicas e meios de cultura para o crescimento de fungos foram realizados em diferentes meses com vista a avaliar se se registavam variações nos resultados de acordo com alterações na temperatura e precipitação. A avaliação dos resultados de quantificação (expressos em CFU/100mL) e representatividade dos fungos (fungos filamentosos e leveduras) nas diferentes matrizes, juntamente com dados relativos aos procedimentos referência para a análise de águas, levaram à escolha do método de filtração por membrana em meio de cultura DRBC para crescimento de fungos. A realização deste estudo em diferentes épocas do ano não permitiu, no entanto, tirar conclusões acerca de uma possível influência das condições meteorológicas na quantidade de fungos presentes nas diferentes águas testadas.

Para avaliar as alterações nas comunidades de fungos isolados em diferentes meios de cultura e por diferentes técnicas recorreu-se a técnicas de biologia molecular, sendo os perfis das populações obtidos pela técnica de DGGE. Os dados resultantes da aplicação desta técnica às amostras de água mostraram que os perfis populacionais obtidos apresentam maiores variações entre diferentes meios de cultura do que entre as diferentes técnicas de

5 CONCLUSÕES

crescimento. Este resultado poderá ser atribuído à diferente composição dos meios ensaiados que os torna obviamente selectivos, sendo portanto diferente a micota cultivável em cada um deles.

Posteriormente foram realizados ensaios, com uma periodicidade mensal, aos três tipos diferentes de águas utilizando a técnica de filtração por membrana e meio de cultura DRBC previamente seleccionados. Da análise dos resultados obtidos verifica-se, tal como esperado, que nas águas mais expostas ao ambiente e às suas alterações os valores de ocorrência de fungos são mais elevados e sofrem maiores variações. Isto verifica-se principalmente para a água superficial, mas também para a água de nascente, provavelmente pelo facto de o local de colheita desta se localizar já no curso de água e não no local de nascente. A água subterrânea está mais protegida das alterações climatéricas pelos solos acima dos seus cursos, o que justifica os baixos valores de quantificação de fungos registados nesta água bem como a maior estabilidade dos resultados obtidos em diferentes épocas do ano. Para confirmar os resultados de ocorrência de fungos obtidos ao longo do tempo, estes testes deverão ser repetidos por novos períodos anuais, com vista a compreender se existe um padrão evolutivo nas populações de fungos, quer em número quer no tipo de fungos presentes.

Mais uma vez, com vista à avaliação dos perfis das comunidades de fungos presentes nas diferentes amostras de água, recorreu-se à técnica de DGGE para a análise das amostras resultantes do estudo de evolução ao longo do tempo. A comparação dos perfis de bandas obtidas para cada água não permitiu estabelecer uma evolução temporal das comunidades de fungos presentes em cada água mas permitiu verificar, tal como era plausível, que diferenças na composição da água se traduzem em diferenças nas populações de fungos presentes.

A comparação da evolução ao longo do tempo dos resultados obtidos com os testes bacteriológicos (MPN/100mL) com os das quantificações de fungos (CFU/100mL) para as mesmas amostras de água não permite que se estabeleça uma relação entre a presença destes dois grupos de microrganismos nas diferentes matrizes.

Relativamente às identificações efectuadas de alguns dos fungos isolados das três águas estudadas, verificou-se que os fungos presentes estão já descritos como sendo parte integrante de habitats aquáticos, registando-se uma predominância da identificação de fungos pertencentes ao *phylum* Ascomycota.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] **Pontius, F. W.** Water Quality and Treatment: A Handbook of Community Water Supplies. 4th Ed. American Water Works Association. McGraw-Hill, Inc. New York. USA. 1990.
- [2] **Maier, R. M., Pepper, I. L., Gerba, C. P.** Environmental Microbiology. Academic Press. San Diego, California. USA. 2000.
- [3] Decreto-Lei nº 243/2001, de 5 de Setembro *In* Diário da República – I Série – A, nº206.
- [4] <http://www.pelotas.rs.gov.br/sanep> (10/09/2008)
- [5] **Eaton, D. A., Clesceri, L. S., Greenberg, A. E.** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th edition. American Public Health Association. Washington, DC. USA. 1995.
- [6] **ISO 9308-1:2000** Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method
- [7] **ISO 7899-2:2000** Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci - Part 2: Membrane filtration method
- [8] <http://www.idexx.com/water> (04/09/2008)
- [9] **Eckner, K. F.** Comparison of Membrane Filtration and Multiple-Tube Fermentation by the Colilert and Enterolert Methods for Detection of Waterborne Coliform Bacteria, *Escherichia coli*, and Enterococci Used in Drinking and Bathing Water Quality. *Appl Environ Microb.* **64(8)**: 3079-3083. 1998.
- [10] **De Hoog, G. S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M. J.** Atlas of Clinical Fungi. 2nd edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht. Netherlands. 2004.
- [11] **Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J.** Brock Biology of Microorganisms, 9th edition. Prentice-Hall International, Inc. New Jersey. USA. 2000
- [12] **Göttlich, E., van der Lubbe, W., Lange, B., Fiedler, S., Melchert, I., Reifenrath, M., Flemming, H., de Hoog, S.** Fungal Flora in Groundwater-derived Public Drinking Water. *Int J Hyg Environ Health.* **205**: 269-279. 2002.
- [13] **Bowman, B. H., Taylor, J. W., White, T. J.** Molecular Evolution of the Fungi: Human Pathogens. *Mol Biol Evol.* **9(5)**: 893-904. 1992.
- [14] **Griffin, D. H.** Fungal Physiology. 2nd Ed. Wiley-Liss, Inc. New York. USA. 1994.

- [15] **Gonçalves, A. B., Russel, R., Paterson, M., Lima, N.** Survey and Significance of Filamentous Fungi from Tap Water. *Int J Hyg Environ Health*. **209**: 257-264. 2006.
- [16] **Hageskal, G., Knutsen, A. K., Gaustad, P., de Hoog, G. S., Skaar, I.** Diversity and Significance of Mould Species in Norwegian Drinking Water. *Appl Environ Microb*. **72(12)**: 7586-7593. 2006.
- [17] **Justé, A., Thomma, B. P. H. J., Lievens, B.** Recent advances in Molecular Techniques to study Microbial Communities in Food-associated matrices and processes. *Food Microbiol*. **25**: 745-761. 2008.
- [18] **Ma Z. and Michailides, T. J.** Approaches for Eliminating PCR Inhibitors and Designing PCR primers for the Detection of Phytopathogenic Fungi. *Crop Prot*. **26**:145-161. 2007.
- [19] **Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H., Wormald, P. J.** An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *J Microb Meth*. **65**: 38-48. 2006.
- [20] NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer User's Manual
- [21] **Jin, G. and Kelley, T. R.** Characterization of Microbial Communities in a Pilot-scale constructed wetland using PFLA and PCR-DGGE analyses. *J. Environ. Sci. Health Part A*. **42**: 1639-1647. 2007.
- [22] <http://www.e-escola.pt/site/topico.asp=topico=339> (30/04/2008)
- [23] **Anderson I. C., Campbell, C. D., Prosser, J. I.** Potential Bias of Fungal 18S rDNA and Internal Transcribed Spacer Polymerase Chain Reaction Primers for Estimating Fungal Biodiversity in Soil. *Environ Microbiol*. **5(1)**: 36-47. 2003.
- [24] **Anderson, I. C. and Cairney, J. W. G.** Diversity and Ecology of Soil Fungal Communities: Increased understanding through the Application of Molecular Techniques. *Environ Microbiol*. **6(8)**: 769-779. 2004.
- [25] **Gardes, M. and Bruns, T. D.** ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes – Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts. *Mol Ecol*. **2**: 113-118. 1993.
- [26] **Bridge, P. D., Arora, D. K., Reddy, C. A., Elander, R. P.** Applications of PCR in Mycology. CAB International. New York. USA. 1998.
- [27] **White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.** Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Genes for Phylogenetics *in* PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc. New York. USA. 1990.

- [28] **Saad, D. S., Kinsey, G. D., Kim, S., Gaylard, C. C.** Extraction of Genomic DNA from Filamentous Fungi in Biofilms on Water-based Paint Coatings. *Int Biodeter Biodegr.* **54**: 99-103. 2004.
- [29] **Manter, D. K. and Vivanco, J. M.** Use of ITS Primers, ITS1F and ITS4, to characterize Fungal Abundance and Diversity in Mixed-template Samples by qPCR and Length Heterogeneity Analysis. *J Microb Meth.* **71**: 7-14. 2007.
- [30] **Larena, A., Salazar, O., González, V., Julián, M. C., Rubio, V.** Design of a Primer for Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer with Enhanced Specificity for Ascomycetes. *J Biotechnol.* **75**: 187-194. 1999.
- [31] **Muyzer, G. and Smalla, K.** Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in Microbial Ecology. *Ant Leeuw Int J G.* **73**: 127-141. 1998.
- [32] **Ercolini, D.** PCR-DGGE Fingerprinting: Novel Strategies for Detection of Microbes in Food. *J Microb Meth.* **56**: 297-314. 2004.
- [33] <http://www.oxoid.com> (06/10/2007)
- [34] **Carvalho, G.** 2008. Comunicação pessoal.
- [35] <http://www.meteo.pt> (21/09/2008)
- [36] http://www.doctorfungus.org/thefungi/Description_index.htm (30/09/2008)
- [37] **Samson, R. A, Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C.** Introduction to Food and Airborne Fungi. 7th Ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht. Netherlands. 2004.
- [38] **Pitt, J. I. and Hocking, A. D.** Fungi and Food Spoilage. 2nd Ed. Blackie Academic & Professional. Cambridge. UK. 1997.
- [39] **Pitt, J. I.** A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. 3th Ed. Food Science Australia. North Ryde, NSW. Australia. 2000.

ANEXO A1 – TESTE COLILERT® (IDEXX LABORATORIES INC., MAINE, USA) PARA QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E *E. COLI*

O teste Colilert® detecta simultaneamente coliformes totais e *E. coli* em amostras de água. Este teste tem por base a Defined Substrate Technology® (DST®) patenteada pela IDEXX. Quando os coliformes metabolizam o nutriente indicador do Colilert®, o ONPG, a amostra muda de cor para amarelo. Quando a *E. coli* metaboliza o nutriente indicador do Colilert®, o MUG, a amostra emite fluorescência. O teste Colilert pode detectar simultaneamente estas bactérias até 1 CFU/100 mL num período de 24 horas mesmo quando estão presentes numa amostra até 2 milhões de bactérias heterotróficas por 100 mL.

Para a utilização do Quanti-Tray®/2000 deve adicionar-se o conteúdo de uma embalagem a 100 mL da amostra de água num frasco estéril, tapar e agitar até dissolver completamente. Colocar esta mistura no Quanti-Tray®/2000 e selar com o IDEXX Quanti-Tray® Sealer, Model 2X. Colocar a amostra selada numa estufa a 35°C ± 0,5°C durante 24 horas, período após o qual os resultados devem ser lidos de acordo com a seguinte tabela:

Tabela A1.1 – Leitura do teste Colilert®: resultados e seu significado.

Aparência	Resultado
Cor menos amarela que no comparador *	Negativo para coliformes totais e <i>E. coli</i>
Cor amarela igual ou mais intensa que no comparador*	Positivo para coliformes totais
Cor amarela e fluorescência igual ou mais intensas que no comparador*	Positivo para <i>E. coli</i>

* Quanti-Tray/2000 (IDEXX Laboratories Inc., Maine, USA)

A fluorescência deve ser observada por submissão do Quanti-Tray®/2000 a uma lâmpada que emite radiação UV a 365 nm.

ANEXO A2 – TESTE ENTEROLERT™ (IDEXX LABORATORIES INC., MAINE, USA) PARA QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROCOCOS

O teste Enterolert™ detecta enterococos tais como *E. faecium* e *E. faecalis* em amostra de água. Este teste tem por base a Defined Substrate Technology® (DST®) patenteada pela IDEXX. Quando os enterococos utilizam a sua enzima β-glucosidase para metabolizar o nutriente indicador do Enterolert™, o 4-methyl-umbelliferyl-β-D-glucoside, a amostra emite fluorescência. O teste Enterolert detecta até 1 CFU/100 mL num período de 24 horas.

Para a utilização do Quanti-Tray®/2000 deve adicionar-se o conteúdo de uma embalagem a 100 mL da amostra de água num frasco estéril, tapar e agitar até dissolver completamente. Colocar esta mistura no Quanti-Tray®/2000 e selar com o IDEXX Quanti-Tray® Sealer, Model 2X. Colocar a amostra selada numa estufa a 41°C ± 0,5°C durante 24 horas, período após o qual os resultados devem ser lidos de acordo com a seguinte tabela:

Tabela A2.1 – Leitura do teste Enterolert™: resultados e seu significado.

Aparência	Resultado
Ausência de fluorescência	Negativo para enterococos
Fluorescência	Positivo para enterococos

A fluorescência deve ser observada por submissão do Quanti-Tray®/2000 a uma lâmpada que emite radiação UV a 365 nm.

ANEXO A3 – FILTRAÇÃO POR MEMBRANA

Para garantir a esterilidade, todo o procedimento tem de ser feito à chama ou numa CFL (câmara de fluxo laminar).

Agitar o frasco com a amostra (6 vezes) de modo a obter uma distribuição uniforme dos microrganismos antes de filtrar ou de preparar as diluições decimais necessárias da amostra.

O número de diluições depende da natureza da água a analisar (Tabela A3.1). A toma da amostra deve ser tal, que após incubação, se tenham desenvolvido entre 20 – 80 colónias sobre a membrana. As diluições decimais são preparadas serialmente em frascos SHOTT DURAN® estéreis.

Tabela A3.1 – Diluições/volumes utilizados em contínuo para cada matriz em estudo.

Matriz	Diluições	Volumes
Água Superficial	1:100	100 mL e 200 mL
Água Subterrânea	1:1 e 1:10	100 mL
Água de Nascente	1:100	100 mL e 200 mL

A rampa de filtração deve ser esterilizada com chama e colocada entre dois bicos de Bunsen, de modo a garantir a esterilidade de todo trabalho. Cada amostra é filtrada através de uma membrana estéril com 47 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm (Millipore®, MA, USA), após o que, com o auxílio de uma pinça estéril, esta é transferida, com a face quadriculada voltada para cima, para a placa de Petri (Ø 90 mm) contendo o meio de cultura, evitando que fique ar entre a membrana e o meio. Fechar as placas com parafilm e colocá-las na estufa a 25°C. As placas foram observadas de dois em dois dias de modo a controlar/avaliar o crescimento microbiano.

ANEXO A4 – CARACTERÍSTICAS DOS MEIOS DE CULTURA TESTADOS

Tabela A4.1 – Características dos meios de cultura utilizados ^[33].

Meio de Cultura	Composição (g/L)	Adição de Cloranfenicol	Aspecto do meio (preparado)	Tipos de fungos isolados	Precauções de utilização	Controlo +	Controlo -
Dichloran-Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)	Peptone 5.0; Glucose 10.0; Potassium dihydrogen phosphate 1.0; Magnesium sulphate 0.5; Dichloran 0.002; Rose-Bengal 0.025; Agar 15.0; pH 5.6 ± 0.2	0,1 g/L (1 vial por 500 mL)	Gel cor-de-rosa	Meio selectivo para isolamento e enumeração de leveduras e bolores existentes em alimentos.	Alguns fungos podem ser inibidos neste meio. O Rosa de Bengal foto-oxida formando compostos tóxicos, pelo que deve ser evitada a exposição à luz.	Sacharomycetes cerevisiae (ATCC 9763)	Escherichia coli (ATCC 25922)
Sabouraud Dextrose Agar	Mycological peptone 10.0; Glucose 40.0; Agar 15.0; pH 5.6 ± 0.2	Utilizar antibióticos para amostras com elevado número de outros fungos ou bactérias (0,4 g cloranfenicol + 0,05 g ciclohexanida por L)	Gel cor de palha a colonido	Meio ácido para isolamento de dermatófitos, outros fungos e leveduras	Alguns fungos patogénicos podem produzir esporos infectivos que se dispersam facilmente no laboratório - trabalhar em CFL	Candida albicans (ATCC 10231)	Não se utiliza
Czapek-Dox Agar	Sodium nitrate 2.0; Potassium chloride 0.5; Magnesium glycerophosphate 0.5; Ferrous sulphate 0.01; Potassium sulphate 0.35; Sucrose 30.0; Agar 12.0; pH 6.8 ± 0.2	Nada referido; Mycopathologia (2005) 159:pp281-289 Glucose czapek com chloramphenicol com referência a método de Johnson & Cui	Gel branco	Indicado para fungos e bactérias capazes de usar nitrato de sódio como fonte de azoto. Indicado também para o isolamento de fungos de géneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> .	Nada referido	Candida albicans (ATCC 10231)	Não se utiliza
Dichloran-Glycerol Chloramphenicol Agar (DGC-18)	Peptone 5.0; Glucose 10.0; Potassium dihydrogen phosphate 1.0; Magnesium sulphate 0.5; Dichloran 0.002; Agar 15.0; Final pH 5.6 ± 0.2	0,1 g/L (1 vial por 500 mL)	Gel cor de palha	Indicado para fungos e bactérias capazes de usar nitrato de sódio como fonte de azoto.	Nada referido	Sacharomycetes cerevisiae (ATCC 9763)	Escherichia coli (ATCC 25922)
Malt Extract Agar (MEA)	Malt extract 30.0; Mycological peptone 5.0; Agar 15.0; pH 5.4 ± 0.2	Nada referido	Gel de cor ambar	Deteção, isolamento e enumeração de leveduras e bolores	Evitar o sobre-aquecimento após o ajuste do pH.	Candida albicans (ATCC 10231)	Não se utiliza

ANEXO A5 – ULTRACLEAN™ MICROBIAL DNA ISOLATION KIT (MO BIO LABORATORIES INC., CA, USA)

1. Num MicroBead Tube colocar 300 µL da solução MicroBead Solution (contém sais e tampão) e 50 µL da solução MD1 (contém SDS - Sodium Dodecyl Sulfate – e outros agentes disruptores).
2. Com uma ansa raspar a periferia o fungo isolado ou a mistura de fungos da placa de Petri (sem raspar meio de cultura) e colocar no mesmo tubo.
3. Colocar os tubos num banho a 65°C durante 10 minutos (este passo permite aumentar o rendimento).
4. Colocar os tubos no FastPrep® FP120A Instrument durante 30 segundos a 4500 rpm (trata-se de uma alteração ao protocolo do fabricante que permite uma disrupção mais rápida e eficiente da parede celular).
5. Centrifugar a 10000x g durante 30 segundos à temperatura ambiente.
6. Transferir o sobrenadante para um novo Collection Tube de 2 mL. É esperado um volume de cerca de 350 µL de sobrenadante.
7. Adicionar 100 µL da solução MD2 (contém agentes de precipitação) ao sobrenadante e incubar em gelo durante 8 minutos.
8. Centrifugar a 10000x g durante 1 minuto numa microcentrifuga a 4°C.
9. Evitando o *pellet*, transferir todo o volume do sobrenadante para um novo Collection Tube de 2 mL. É esperado um volume de cerca de 450 µL de sobrenadante.
10. Adicionar 900 µL da solução MD3 (solução salina concentrada) ao sobrenadante e agitar no vortex durante 5 segundos.
11. Transferir aproximadamente de 700 µL para o Spin Filter e centrifugar a 10000x g durante 30 segundos à temperatura ambiente. Descartar o líquido, adicionar o restante sobrenadante ao Spin Filter e voltar a centrifugar a 10000x g durante 30 segundos à temperatura ambiente. Descartar o líquido. *Nota:* pode ser necessário repetir estes passos 2 ou 3 vezes até que todo o sobrenadante passe pelo Spin Filter.
12. Adicionar 300 µL da solução MD4 (solução à base de etanol) e centrifugar a 10000x g durante 30 segundos à temperatura ambiente.
13. Descartar o líquido.
14. Centrifugar a 10000x g durante 1 minuto à temperatura ambiente.

15. Com cuidado para não salpicar, transferir o filtro para um novo Collection Tube de 2 mL.
16. Adicionar 50 μ L da solução MD5 (tampão de eluição) no centro da membrana do filtro.
17. Centrifugar a 10000x g durante 1 minuto à temperatura ambiente.
18. Deitar fora o filtro. O DNA no tubo está pronto para qualquer aplicação posterior. Não são necessárias quaisquer etapas adicionais.

ANEXO A6 – EPICENTRE WATERMASTER™ DNA EXTRACTION KIT (EPICENTRE® BIOTECHNOLOGIES, WI, USA)

Processamento da amostra

Filtrar o volume desejado de água por uma membrana estéril de poro 0.45µm Microfil® V, de 47 mm de diâmetro (Millipore®, MA, USA). Conservar a membrana a -20°C até à extracção do DNA. Com uma tesoura esterilizada em álcool a 70% cortar a membrana ao meio e, com o auxílio de duas pinças, enrolar cada metade e colocá-la num microtubo estéril de 2mL, virando a face superior do filtro para o interior do tubo.

Fase I: Lise

1. A cada microtubo de 2 mL juntar 300 µL da WaterMaster Lysis Solution.
2. Adicionar 1 µL de Proteinase K (50 µg/µL).
3. Centrifugar 10 segundos a 10000x g numa microcentrifuga a 4°C para dispersar qualquer espuma que se tenha formado. Vortexar 2 segundos para resuspender o pellet.
4. Incubar a 65-70°C durante 15 minutos.
5. Arrefecer as amostras até 37°C (cerca de 15 minutos) e adicionar 1 µL de RNase A (5 µg/µL) a cada tubo, misturando bem.
6. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
7. Colocar as amostras em gelo durante 3-5 minutos.

Fase II: Purificação

8. A cada tubo de 300 µL de amostra lisada adicionar 175 µL de MPC Protein Precipitation Reagent e misturar no vortex durante 10 segundos.
9. Centrifugar durante 10 minutos a 10000x g numa microcentrifuga a 4°C.
10. Transferir o sobrenadante para um microtubo limpo e descartar os pellets.
11. Centrifugar o microtubo com o sobrenadante durante 10 minutos a 10000x g numa microcentrifuga a 4°C.
12. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo limpo e descartar os pellets.
13. Adicionar 500 µL de isopropanol a cada tubo contendo o sobrenadante. Inverter os tubos 30-40 vezes.
14. Sedimentar o DNA centrifugando durante 15 minutos à velocidade máxima numa microcentrifuga a 4°C.

15. Remover o isopropanol sem descolar os pellets de DNA.
16. Ressuspender os pellets com 500 μ L de etanol a 70%. Centrifugar rapidamente. Com cuidado, remover o etanol.
17. Ressuspender o DNA em cada tubo com 100 μ L de TE Buffer.

ANEXO A7 – POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

A escolha dos *primers* bem como o número de reacções a realizar e o programa de PCR a utilizar foi realizada com base em estudos anteriores e tendo em conta o tipo de amostra. Assim, após algumas etapas de optimização do processo, concluiu-se que o melhor processo seria a realização de *nested*-PCR (isto é, realização de uma segunda reacção de PCR a partir do produto da primeira reacção de PCR), utilizando os seguintes pares de *primers*:

Primeira reacção de PCR: ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3');

Segunda reacção de PCR: ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGC-3') com cauda CG e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Assim, as reacções foram realizadas nas seguintes condições (tabelas A7.1 e A7.2):

Tabela A7.1 – Composição da mistura utilizada na primeira reacção de PCR.

Volume (µL)	Reagente
1	DNA
18,40	Água MilliQ
1,00	50mM MgCl ₂ (Bioline Ltd, London, UK)
2,50	10x ImmoBuffer (Bioline Ltd, London, UK)
1,00	dNTP 10 Mm
0,50	ITS1F 50 pmol
0,50	ITS4 50 pmol
0,10	IMMOLASE™ DNA Polymerase 5u/µL (Bioline Ltd, London, UK)
25,00	Total

Tabela A7.2 – Composição da mistura utilizada na segunda reacção de PCR.

Volume (µL)	Reagente
1	DNA (produto da primeira reacção de PCR)
37,80	Água MilliQ
2,00	50mM MgCl ₂ (Bioline Ltd, London, UK)
5,00	10x ImmoBuffer (Bioline Ltd, London, UK)
2,00	dNTP 10 Mm
1,00	ITS5-GC 50 pmol
1,00	ITS4 50 pmol
0,20	IMMOLASE™ DNA Polymerase 5u/µL (Bioline Ltd, London, UK)
50,00	Total

Em cada reacção de PCR todos os reagentes (excepto o DNA) são adicionados num eppendorf, devendo multiplicar-se o volume de cada reagente pelo número total de amostras a

amplificar (incluindo um branco). É depois dispensado em cada tubo de PCR o volume para reacção a realizar (24 µL para a 1ª reacção de PCR e 49 µL para a 2ª reacção de PCR) e adicionado a cada tubo 1 µL do DNA que se pretende amplificar. No caso do branco, utilizar em vez do DNA o mesmo volume de água MilliQ.

Os tubos de PCR são colocados no termociclador *Termocycler T3000* (Biometra®, Göttingen, Germany) e dá-se início à reacção de PCR de acordo com o seguinte programa (tabela A7.3):

Tabela A7.3 – Programa de PCR utilizado para as duas reacções do *nested*-PCR.

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	} 35 ciclos
95	7	
94	1	
55	1	
72	1	
72	5	
4	Fim	

ANEXO A8 - DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (DGGE) – THE DCode™ UNIVERSAL MUTATION DETECTION SYSTEM (BIO-RAD LABORATORIES INC., CA, USA)*Fase 0: Preparação das soluções*

Antes de se iniciar a fase de montagem do DGGE devem ser preparadas várias soluções, cujo procedimento de preparação se descreve de seguida:

Tabela A8.1 – Solução stock de tampão TAE 50x.

Reagente	Quantidade
Trizma® Base	121 g
Ácido acético glacial	28,55 mL
EDTA 0.5M (pH 8.0)	50 mL
Água MilliQ	Prefazer a 500 mL

Tabela A8.2 – Soluções para formação do gradiente num gel a 6% acrilamida.

Reagente	Solução 100%	Solução 0%
Acrilamida/Bisacrilamida 40% (37.5:1)	15 mL	15 mL
Formamida	40 mL	—
TAE 50x	1 mL	1 mL
Glicerol	2 mL	2 mL
Ureia	42.16 g	—
Água MilliQ	Prefazer a 100 mL	Prefazer a 100 mL

Tabela A8.3 – Gel Loading Dye (2x).

Reagente	Quantidade
2% Bromophenol Blue	0.5 mL
2% Xylene Cyanol	0.5 mL
100% Glicerol	14 mL
Água MilliQ	5 mL

Fase I: Montagem

1. Usando papel de laboratório e etanol a 70% limpar bem vidros, espaçadores e borrachas. Não utilizar detergentes à base de sabão ou detergentes abrasivos.

2. Montar a sandwich colocando o vidro mais pequeno sobre o maior com os espaçadores alinhados de lado (com as ranhuras viradas para o vidro mais pequeno e os recortes para o lado de fora). Prender as *clamps* (apertar bem para manter tudo junto) e colocar todo o conjunto no local de montagem do suporte. Soltar as *clamps* ligeiramente e apertar de novo com o cartão de alinhamento entre os vidros e os espaçadores. Sem remover o cartão, retirar a sandwich do suporte e retirar uma *clamp* de cada vez para selar os vidros com silicone (dos lados onde estão os espaçadores). Voltar a colocar a sandwich no suporte e voltar re-ajustar as *clamps*.

3. Colocar as borrachas no suporte, inserir o conjunto alinhado e apertar os ganchos laterais.

Fase II: Preparação do Gel

4. Preparar o *plug* (1 mL solução 0%, 3 µL TEMED - N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine - e 10 µL APS 10% - Ammonium Persulfate) e com uma seringa inseri-lo entre os vidros junto a um dos espaçadores, garantindo que cobre toda a base do gel. Marcar no vidro o percurso vertical do *plug* (nesta zona o gradiente poderá não ser consistente). Deixar polimerizar durante pelo menos 30 min.

5. Acertar a roldana para 12 mL. Preparar 13 mL de cada solução (1 mL em excesso) para os gradientes pretendidos (ver tabela A8.4) a partir das soluções 0% e 100%.

Tabela A8.4 – Preparação das soluções para formação do gradiente num gel de DGGE.

	0%	25%	75%
Solução stock 0%	5 mL	9.75 mL	3.25 mL
Solução stock 100%	—	3.25 mL	9.75 mL
TEMED	6.25 µL	13 µL	13 µL
APS	25 µL	65 µL	65 µL

6. Introduzir as soluções de 25 e 75% nas seringas, acertar o volume a 12 mL e montá-las na roldana. Montar os tubos nas seringas.

7. Com um movimento lento e constante, rodar a roldana até que as duas seringas estejam vazias (a agulha deverá estar colocada a meio dos vidros para que as soluções se espalhem uniformemente).

NOTA: Os passos 5 a 7 têm de ser realizados em aproximadamente 15 minutos, período após o qual se iniciará a polimerização do gel.

8. Adicionar, lentamente para não provocar alterações no gradiente formado, a solução 0% (*stucking*) e colocar o pente com os dentes que irão formar os poços, tendo cuidado para que não se formem bolhas de ar. Marcar no vidro o limite entre o gradiente e a solução *stucking*. Deixar polimerizar durante pelo menos 2 horas.

Fase III: Corrida

9. Preparar 7 L de TAE 0.5X e encher a tina. Preparar mais 1 L desta solução e reservar para posteriores acertos no volume. Pré-aquecer o tampão a 60 °C; esta etapa demora cerca de 2 horas.

10. Retirar as *clamps* do suporte de montagem com os géis já polimerizados, retirar os pentes e prender o conjunto ao suporte de corrida.

11. Lavar os poços com tampão TAE 0.5X quente (retirar da tina) com o auxílio de uma seringa. Este passo permite a limpeza de excessos de gel que possam ter ficado nos poços aquando da retirada dos pentes.

12. Colocar as amostras (30 µL do produto de PCR + 10 µL de 2x Gel Loading Dye) nos poços, tendo em atenção que os marcadores devem ser colocados no primeiro e último poços, ladeando as amostras.

13. Desligar o aparelho DCODE, retirar a tampa e inserir o suporte de corrida. Re-colocar a tampa e voltar a ligar o aparelho. (NOTA: este passo deve ser realizado o mais rapidamente possível, de modo a evitar que a temperatura baixe dos 55 °C)

14. Aguardar até que a temperatura atinja pelo menos 58 °C e iniciar a corrida a 200V até que as amostras saiam dos poços, mas sem nunca ultrapassarem o risco que limita o início do gradiente. Parar a corrida e programar para 16 horas a 80V. Reiniciar a corrida.

Fase IV: Revelação do gel

15. Quando a electroforese terminar, retirar a tampa do aparelho e remover os vidros com os géis das *clamps*. Com cuidado, retirar o vidro mais pequeno e os espaçadores, deixando o gel exposto sobre o vidro maior.

16. Colocar o vidro com o gel numa caixa (protegida da luz com papel de alumínio) contendo uma solução de SYBR[®] Gold (Invitrogen[™] - Molecular Probes[™], OR, USA) e deixar em agitação durante 30 minutos.

17. Transferir o gel, com o auxílio de película aderente, para a superfície do transiluminador e tirar a fotografia ao gel com exposição à luz UV (365 nm).

Fase V: Tratamento dos géis

Após revelação dos géis, as fotografias obtidas são tratadas utilizando o *software* BioNumerics, version 5.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) para obtenção dos dendogramas e estudo dos perfis obtidos.

ANEXO A9 – IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

As placas resultantes das análises aos diferentes tipos de água são guardadas a 4°C após 7 dias de incubação a 25°C (excepto em casos de crescimento mais lento dos fungos que justifique a necessidade mais tempo de incubação para desenvolvimento das estruturas reprodutoras). Posteriormente, com base no aspecto macroscópico das colónias, seleccionou-se uma de cada tipo diferente por cada amostra de água analisada e procedeu-se ao seu isolamento para posterior identificação. Independentemente do meio de cultura utilizado nos testes, todos os fungos foram isolados para placas de Petri contendo MEA, inoculando no centro da placa uma pequena porção da periferia da colónia a isolar. Este processo repete-se tantas vezes quanto necessário até garantir que a colónia isolada está pura.

Procede-se então à preservação em suspensão de esporos de cada colónia isolada. Com o auxílio de uma ansa estéril raspa-se um pouco da colónia isolada e transfere-se para um criotubo contendo meio SS (0,47 mL de Tween[®] 80 + 0,5 g de agar + 1 L de água bi-distilada) e Glicerol 60% (1:1 v/v). As suspensões de esporos devem ser conservadas a -20°C e/ou a -80°C.

A partir das suspensões de esporos preparam-se então placas de três pontos. Com uma ansa estéril, após homogeneização da suspensão, toca-se na placa de Petri contendo MEA em três pontos equidistantes e deixa-se em repouso até que o meio absorva totalmente a gota da suspensão de esporos. Neste caso, o meio de cultura MEA deve estar suplementado com solução TMS (*Trace Metal Solution* constituída por 1g ZnSO₄.7H₂O + CuSO₄.5H₂O em 100 mL de água bi-distilada) na razão de 0,5 mL por cada 500 mL de meio, de modo a evitar o crescimento de colónias atípicas em tamanho ou cor ^[37]. As placas de Petri são incubadas durante 7 dias em estufa a 25°C, período após o qual se procede à medição do diâmetro das três colónias bem como à descrição do seu aspecto morfológico macroscópico (em termos de cor da colónia, cor do verso, forma, margens, elevação e textura).

A partir de uma destas colónias é então realizada uma preparação sobre lâmina para observação das estruturas de frutificação do isolado em estudo. Esta é feita colocando uma pequena quantidade do fungo a identificar sobre a lâmina e juntando uma gota de etanol (para eliminar as estruturas hidrofóbicas em excesso); adiciona-se depois uma gota de ácido láctico, tapa-se a preparação com a lamela e sela-se com verniz ^[10,37]. A observação das preparações foi realizada em microscópio óptico OLYMPUS BH2-RFCA e as fotografias das estruturas

observadas foram tiradas com uma câmara fotográfica digital OLYMPUS DP11 acoplada ao microscópio.

As identificações dos fungos filamentosos foram realizadas com base em chaves de identificação, descrição das estruturas observáveis ao microscópio e respectivo tamanho e ainda fotografias previamente publicadas. Foram para tal consultados diversos livros.

[10,37,38,39]

ANEXO A10 – IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

Todo o procedimento deve ser efectuado em condições de assepsia numa câmara de fluxo laminar (CFL).

Cada levedura é isolada pela técnica de sementeira por riscado em meio MEA. Este processo repete-se tantas vezes quanto necessário até se obterem colónias isoladas e puras (semelhantes em cor, forma e tamanho).

A identificação das leveduras, após isolamento, foi realizada utilizando as galerias API ID 32 C (BioMérieux S.A., Mercy l'Etoile, France), de acordo com as instruções do fabricante.

Após isolamento, toca-se com uma zaragatoa estéril descartável numa colónia e transfere-se para a ampola de “Suspension medium”, que por sua vez está inserida no densitómetro, até se obter o valor de 2 na escala de McFarland. Se o valor estiver abaixo de 2, retira-se mais um pouco de colónia e verifica-se se o valor já é de 2. Repete-se esta operação sempre que necessário. Se a quantidade de colónias fizer ultrapassar o valor de 2, é necessário baixar o valor lido através da diluição por adição de “Suspension medium”. O CA deve ser $2,0 \pm 0,1$ (requisito do método).

Com uma micropipeta retiram-se 250 µL da solução previamente preparada que se adicionam à ampola que contém “C-medium”. Com a ajuda da mesma pipeta homogeneiza-se a solução. Marcar a parte lateral da galeria API com a referência da amostra. Em seguida, enchem-se todos os poços da galeria API com 135 µL da solução preparada em “C-medium”, evitando a formação de bolhas de ar. Fechar a galeria API com a tampa e incubar em estufa a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48h.

A leitura é efectuada após 48h e são registados os resultados das reacções de fermentação/assimilação dos açúcares em impresso que acompanha as galerias API. A identificação é obtida com o *software apiweb*TM (BioMérieux S.A., Mercy l'Etoile, France).

ANEXO A11 – QUANTIFICAÇÃO DE DNA (VALORES OBTIDOS A PARTIR DO NANODROP® ND-1000 SPECTROPHOTOMETER)

Tabela A11.1 - Quantificação do DNA obtido das amostras resultantes da comparação de diferentes técnicas e meios de cultura para crescimento de fungos presentes em amostras de água.

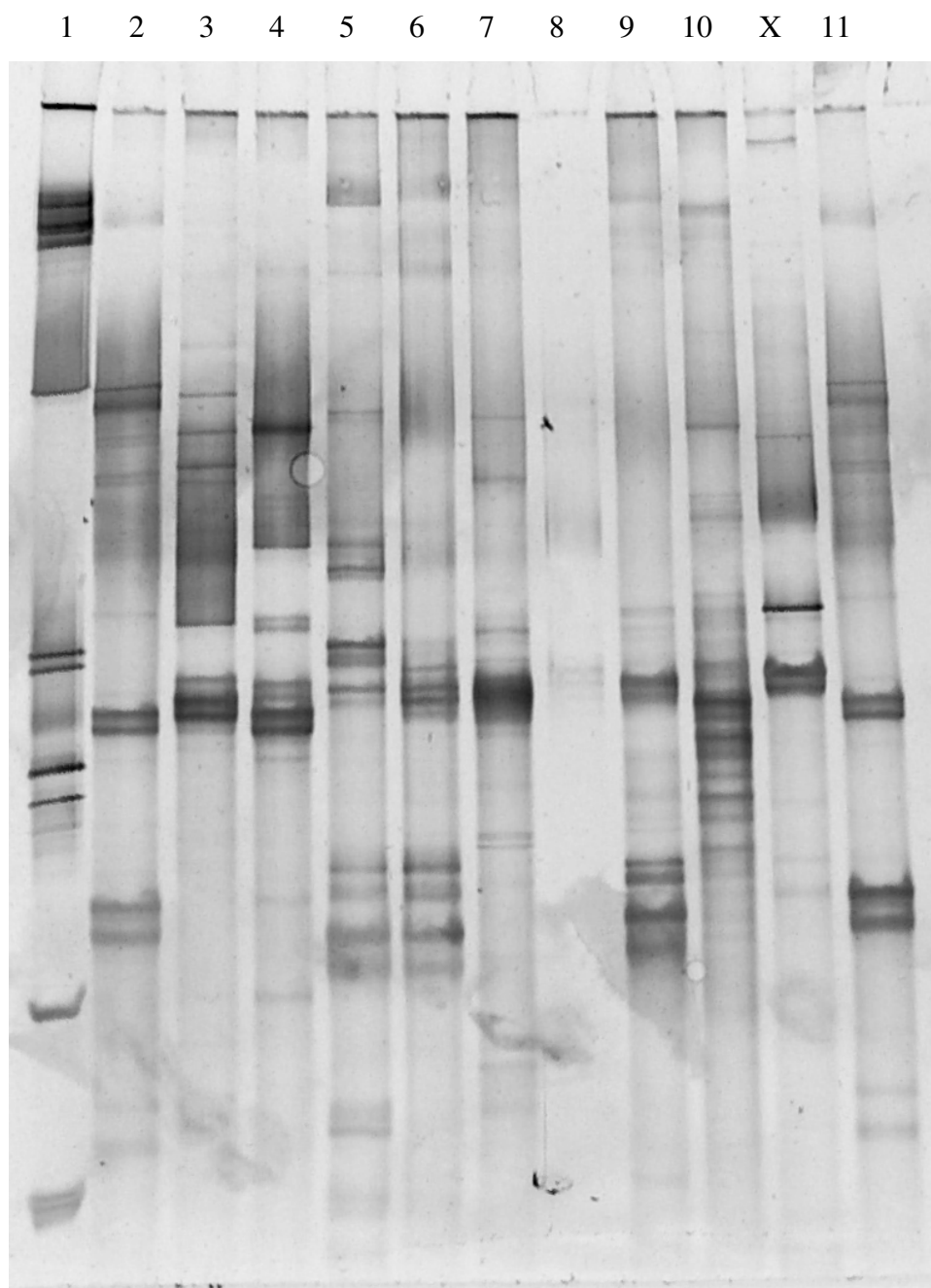
Identificação da amostra		Concentração (ng/μL)	Abs 260 nm	Abs 230 nm	Abs 280 nm	<u>Abs 260</u> <u>Abs 280</u>	<u>Abs 260</u> <u>Abs 230</u>
Comparação de meios de cultura - Água Superficial	Não Tratada Superficial – Incorporação – DRBC	7,3	0,146	0,229	0,090	1,62	0,64
	Não Tratada Superficial – Espalhamento – DRBC	13,3	0,266	1,020	0,186	1,43	0,26
	Não Tratada Superficial FM - DRBC	46,4	0,928	1,579	0,768	1,21	0,59
	Não Tratada Superficial FM – Sabouraud Dextrose Agar	24,2	0,483	0,875	0,411	1,17	0,55
	Não Tratada Superficial FM – Czapek-Dox Agar	91,4	1,828	2,008	1,084	1,69	0,91
	Não Tratada Superficial FM - DGC-18	152,3	3,047	2,622	1,910	1,60	1,16
	Não Tratada Superficial FM - MEA	91,1	1,821	1,866	1,131	1,61	0,98
	Não Tratada Superficial – FM (sem crescimento)	20,7	0,414	0,599	0,291	1,42	0,69
Comparação de meios de cultura - Água de Nascente	Não Tratada de Nascente – Incorporação – DRBC	11,7	0,235	0,327	0,146	1,61	0,72
	Não Tratada de Nascente – Espalhamento – DRBC	96,9	1,938	1,674	1,028	1,88	1,16
	Não Tratada de Nascente FM - DRBC	90,4	1,809	2,270	1,206	1,50	0,80
	Não Tratada de Nascente FM – Sabouraud Dextrose Agar	65,1	1,302	1,210	0,761	1,71	1,08
	Não Tratada de Nascente FM – Czapek-Dox Agar	78,0	1,561	3,857	0,919	1,70	0,40
	Não Tratada de Nascente FM - DGC-18	59,5	1,191	1,439	0,768	1,55	0,83
	Não Tratada de Nascente FM - MEA	139,5	2,789	2,050	1,568	1,78	1,36
	Não Tratada de Nascente – FM (sem crescimento)	4,1	0,083	0,710	0,054	1,52	0,12
Comparação de meios de cultura - Água Subterrânea	Não Tratada Subterrânea – Incorporação – DRBC	10,5	0,211	0,587	0,141	1,49	0,36
	Não Tratada Subterrânea FM - DRBC	25,7	0,515	1,114	0,342	1,51	0,46
	Não Tratada Subterrânea FM – Sabouraud Dextrose Agar	68,4	1,369	2,312	1,006	1,36	0,59
	Não Tratada Subterrânea FM – Czapek-Dox Agar	59,8	1,196	1,304	0,642	1,86	0,92
	Não Tratada Subterrânea FM - DGC-18	8,2	0,164	0,294	0,091	1,80	0,56
	Não Tratada Subterrânea FM - MEA	155,3	3,105	3,412	1,751	1,77	0,91
	Não Tratada Subterrânea – FM (sem crescimento)	3,0	0,061	0,741	0,033	1,84	0,08

Tabela A11.2 - Quantificação do DNA obtido das amostras resultantes da avaliação da variação da ocorrência de fungos presentes em amostras de água ao longo do tempo.

Identificação da amostra		Concentração (ng/μL)	Abs 260 nm	Abs 230 nm	Abs 280 nm	Abs 260 Abs 280	Abs 260 Abs 230	
Água Superficial	Filtração por Membrana	Outubro 2007	37,4	0,749	1,443	0,442	1,70	0,52
		Novembro 2007	5,8	0,116	0,386	0,069	1,68	0,30
		Dezembro 2007	25,5	0,511	1,565	0,391	1,31	0,33
		Janeiro 2008	94,3	1,886	1,877	1,405	1,34	1,00
		Fevereiro 2008	16,2	0,323	0,480	0,290	1,11	0,67
		Março 2008	33,5	0,670	0,948	0,538	1,25	0,71
		Abril 2008	135,8	2,715	2,891	1,442	1,88	0,94
		Mai 2008	21,9	0,438	0,723	0,389	1,13	0,61
		Junho 2008	19,9	0,399	0,603	0,286	1,39	0,66
		Julho 2008	33,5	0,670	0,930	0,394	1,70	0,72
		Agosto 2008	60,7	1,214	1,389	0,765	1,59	0,87
Água Subterrânea	Filtração por Membrana	Outubro 2007	25,7	0,515	1,114	0,342	1,51	0,46
		Novembro 2007	41,7	0,833	1,499	0,694	1,20	0,56
		Dezembro 2007	7,2	0,144	0,508	0,083	1,74	0,28
		Janeiro 2008	31,9	0,638	1,199	0,531	1,20	0,53
		Fevereiro 2008	17,3	0,345	0,730	0,296	1,17	0,47
		Março 2008	44,4	0,888	1,015	0,625	1,42	0,87
		Abril 2008	78,4	1,569	1,961	0,873	1,80	0,80
		Mai 2008	91,9	1,839	1,406	1,146	1,61	1,31
		Junho 2008	51,8	1,035	0,884	0,547	1,89	1,17
		Julho 2008	49,4	0,988	0,768	0,518	1,91	1,29
		Agosto 2008	34,5	0,690	0,748	0,399	1,73	0,92
Água de Nascente	Filtração por Membrana	Outubro 2007	37,9	0,758	0,682	0,441	1,72	1,11
		Novembro 2007	34,2	0,684	0,938	0,454	1,51	0,73
		Dezembro 2007	43,2	0,865	0,955	0,526	1,64	0,91
		Janeiro 2008	43,4	0,868	1,261	0,780	1,11	0,69
		Fevereiro 2008	18,6	0,372	1,049	0,297	1,25	0,35
		Março 2008	47,4	0,948	1,113	0,522	1,82	0,85
		Junho 2008	18,4	0,368	0,478	0,218	1,69	0,77
		Julho 2008	56,8	1,136	0,695	0,569	2,00	1,63

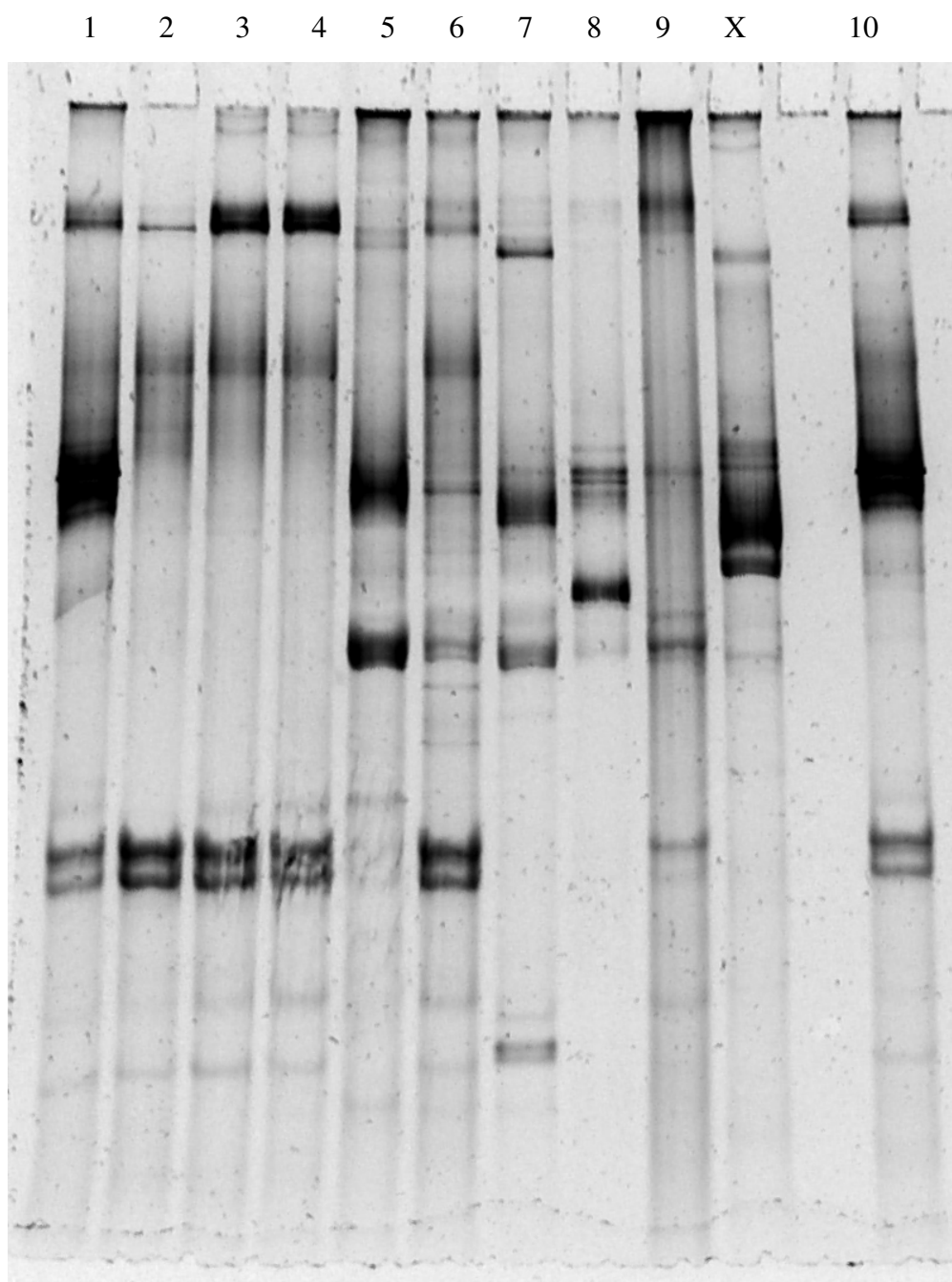
ANEXO A12 – GÉIS DE DGGE

Figura A12.1 – Gel de DGGE para comparação de métodos e meios de cultura para crescimento de fungos –
Água Superficial – Outubro 2007.



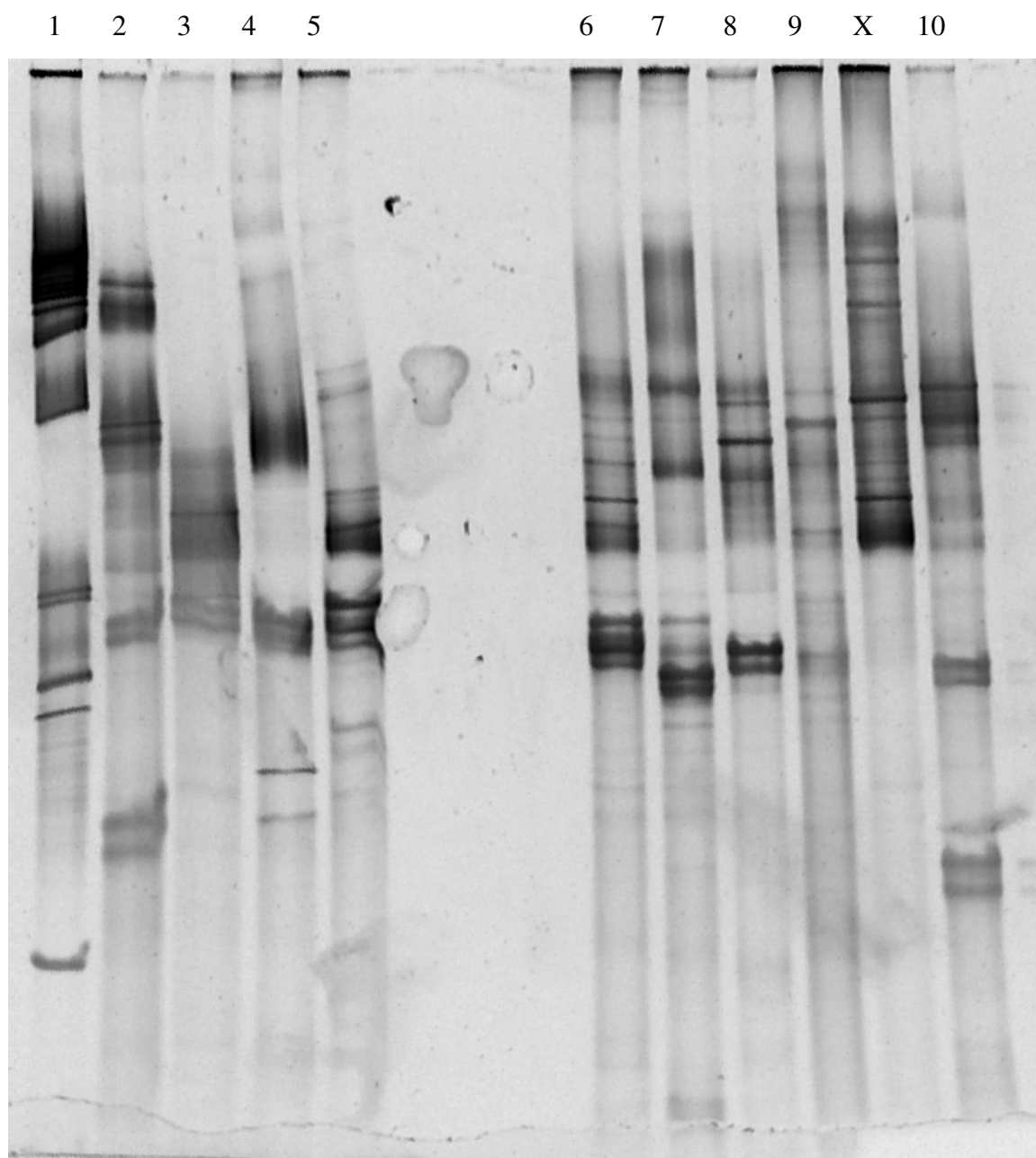
Linha 1: 1Kb Plus; **Linhas 2 e 11:** Marcador; **Linha 3:** Análise pela técnica de incorporação com crescimento dos fungos em meio de cultura DRBC; **Linha 4:** Análise pela técnica de espalhamento com crescimento dos fungos em meio de cultura DRBC; **Linhas 5 a 9:** Análises pela técnica de filtração por membrana com crescimento dos fungos nos meios de cultura DRBC, Sabouraud Dextrose Agar, Czapek-Dox Agar, DGC-18 e MEA, respectivamente; **Linha 10:** Análise pela técnica de filtração por membrana sem crescimento fúngico.

Figura A12.2 – Gel de DGGE para comparação de métodos e meios de cultura para crescimento de fungos – Água de Nascente – Outubro 2007.



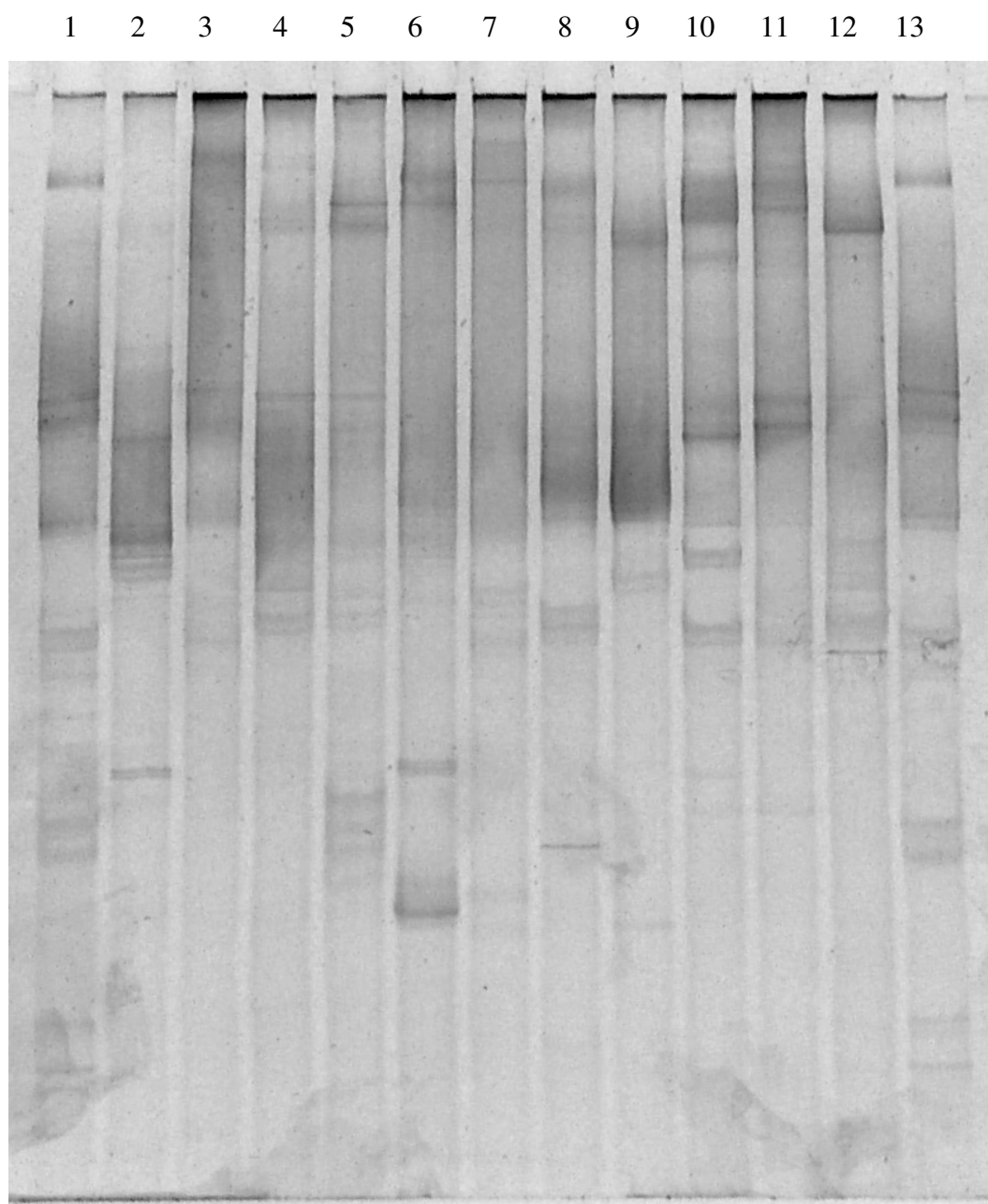
Linhas 1 e 10: Marcador; **Linha 2:** Análise pela técnica de incorporação com crescimento dos fungos em meio de cultura DRBC; **Linha 3:** Análise pela técnica de espalhamento com crescimento dos fungos em meio de cultura DRBC; **Linhas 4 a 8:** Análises pela técnica de filtração por membrana com crescimento dos fungos nos meios de cultura DRBC, Sabouraud Dextrose Agar, Czapek-Dox Agar, DGC-18 e MEA, respectivamente; **Linha 9:** Análise pela técnica de filtração por membrana sem crescimento fúngico.

Figura A12.3 – Gel de DGGE para comparação de métodos e meios de cultura para crescimento de fungos – Água Subterrânea – Outubro 2007.



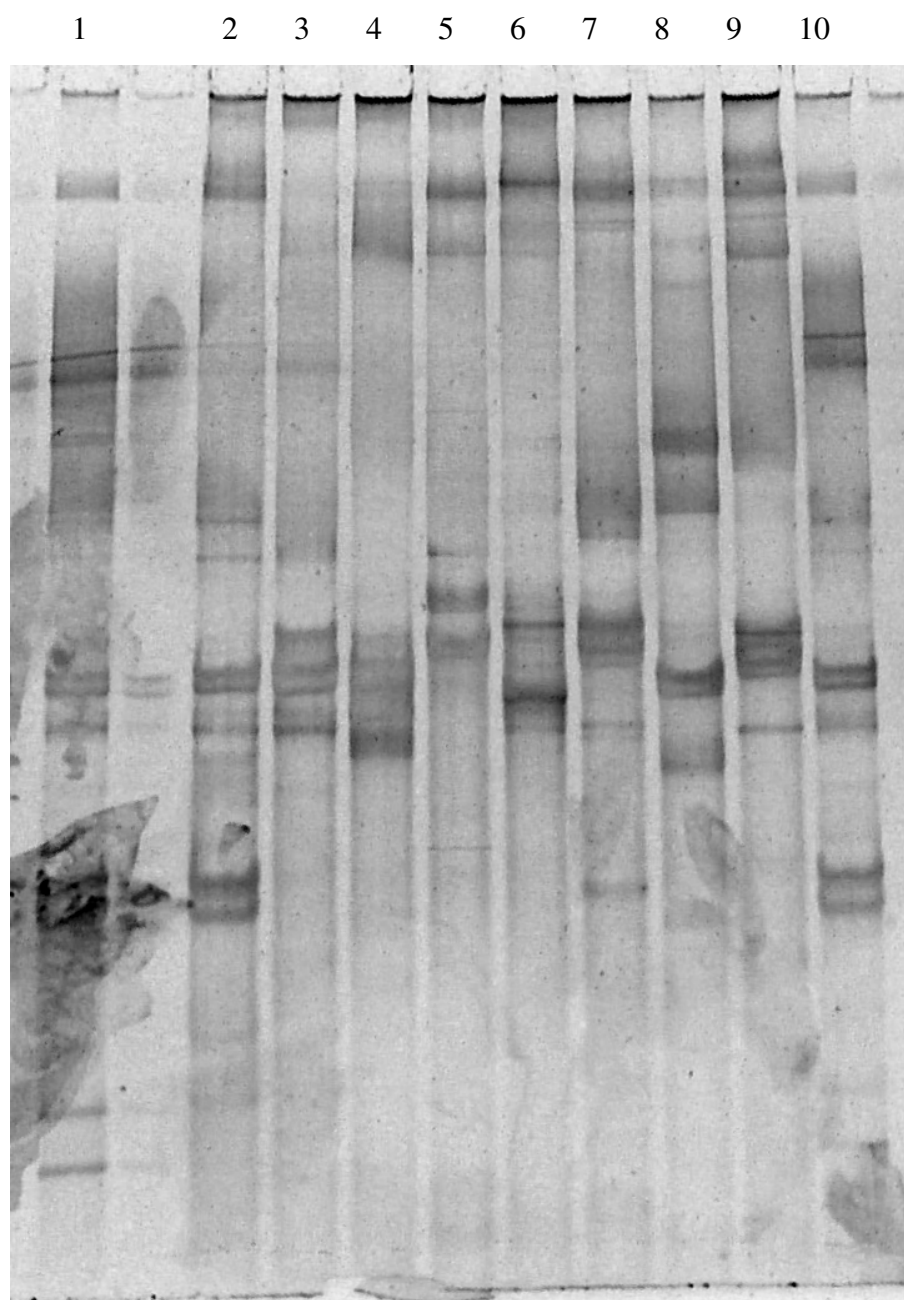
Linha 1: 1Kb Plus; **Linhas 2 e 10:** Marcador; **Linha 3:** Análise pela técnica de incorporação com crescimento dos fungos em meio de cultura DRBC; **Linhas 4 a 8:** Análises pela técnica de filtração por membrana com crescimento dos fungos nos meios de cultura DRBC, Sabouraud Dextrose Agar, Czapek-Dox Agar, DGC-18 e MEA, respectivamente; **Linha 9:** Análise pela técnica de filtração por membrana sem crescimento fúngico.

Figura A12.4 – Gel de DGGE para avaliação da variação da ocorrência de fungos ao longo tempo – Água Superficial.



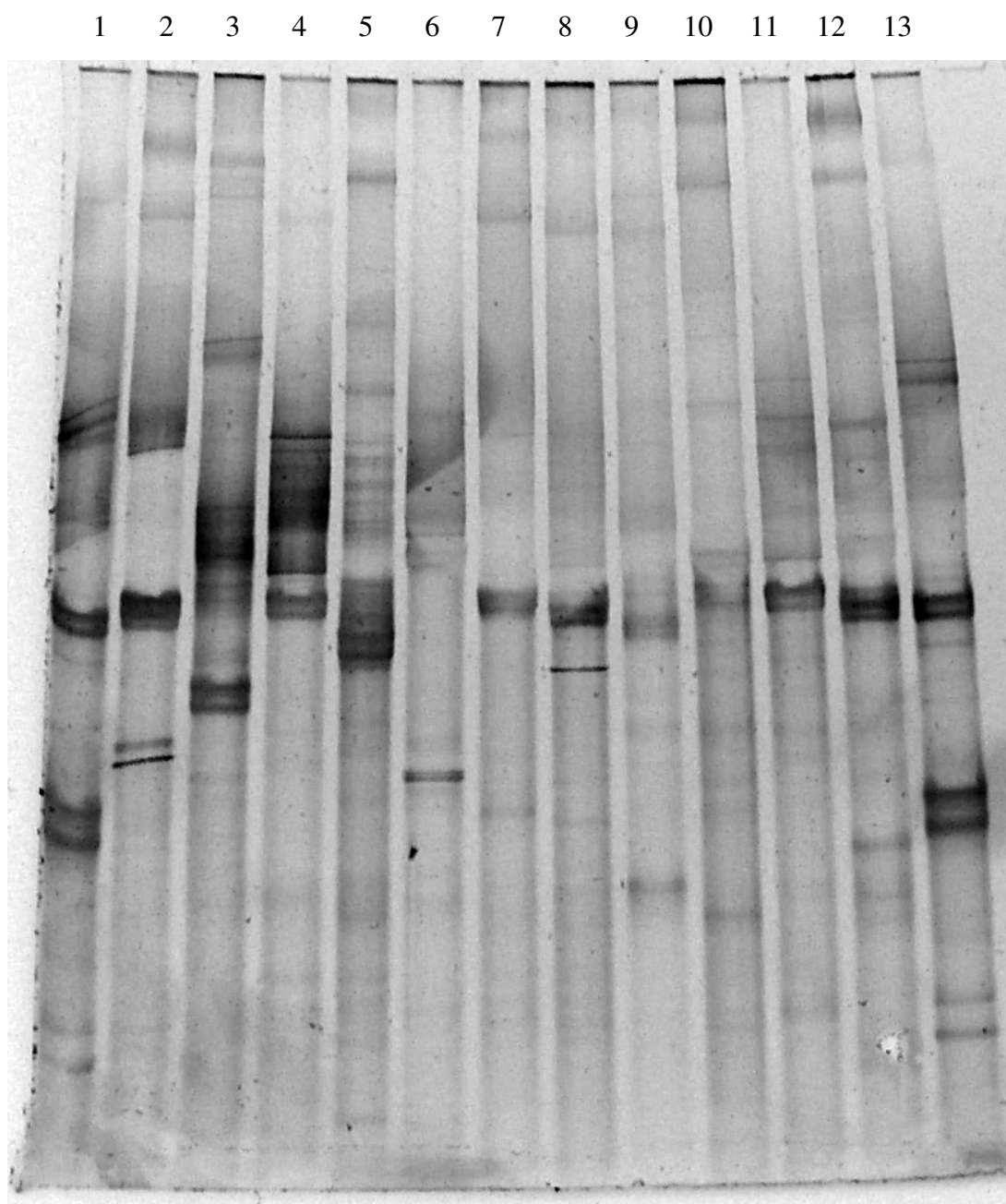
Linhas 1 e 13: Marcador; **Linhas 2 a 12:** Análises pela técnica de filtração por membrana realizadas nos meses de Out'07, Nov'07, Dez'07, Jan'08, Fev'08, Mar'08, Abr'08, Mai'08, Jun'08, Jul'08 e Ago'08, respectivamente.

Figura A12.5 – Gel de DGGE para avaliação da variação da ocorrência de fungos ao longo tempo – Água de Nascente.



Linhas 1 e 10: Marcador; **Linhas 2 a 9:** Análises pela técnica de filtração por membrana realizadas nos meses de Out'07, Nov'07, Dez'07, Jan'08, Fev'08, Mar'08, Jun'08 e Jul'08, respectivamente.

Figura A12.6 – Gel de DGGE para avaliação da variação da ocorrência de fungos ao longo tempo – Água Subterrânea.



Linhas 1 e 13: Marcador; **Linhas 2 a 12:** Análises pela técnica de filtração por membrana realizadas nos meses de Out'07, Nov'07, Dez'07, Jan'08, Fev'08, Mar'08, Abr'08, MAi'08, Jun'08, Jul'08 e Ago'08, respectivamente.

ANEXO A13 – COMPARAÇÃO DOS DADOS DE OCORRÊNCIA DE FUNGOS COM DADOS DE PRECIPITAÇÃO E DE TEMPERATURA DO AR

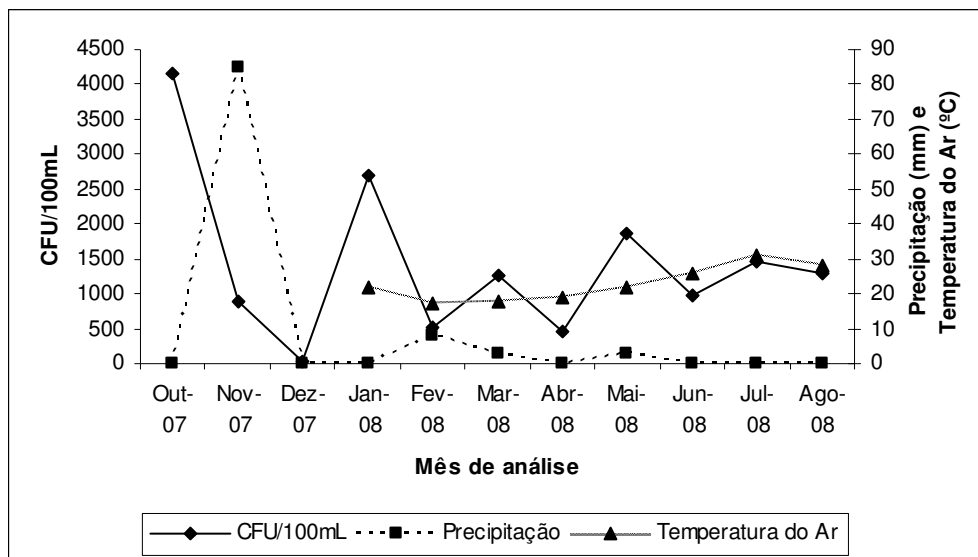


Figura A13.1 – Comparação dos valores de ocorrência de fungos ao longo do tempo (CFU/100mL) das amostras de água superficial com os valores de precipitação (mm) e de temperatura do ar (°C) registrados nos dias de colheita das amostras em cada mês de análise.

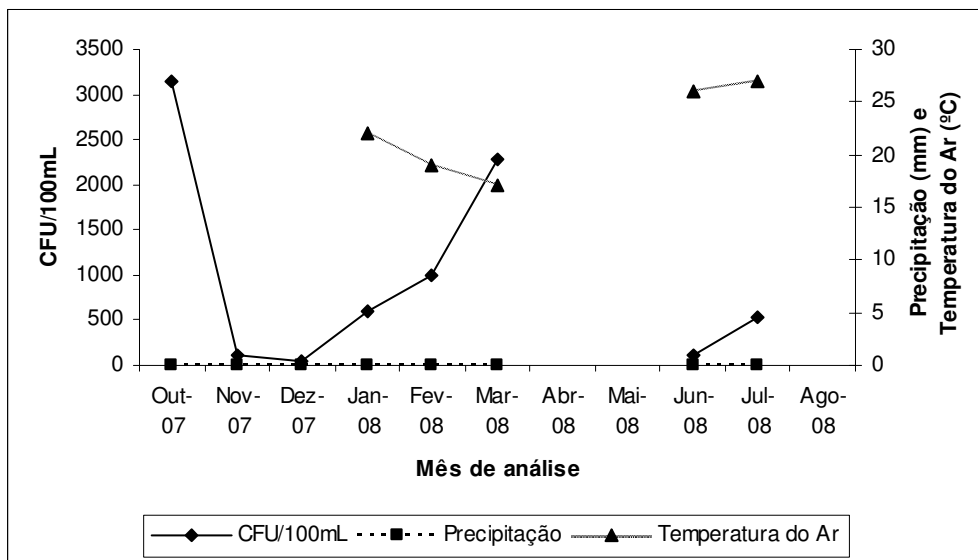


Figura A13.2 – Comparação dos valores de ocorrência de fungos ao longo do tempo (CFU/100mL) das amostras de água de nascente com os valores de precipitação (mm) e de temperatura do ar (°C) registrados nos dias de colheita das amostras em cada mês de análise.

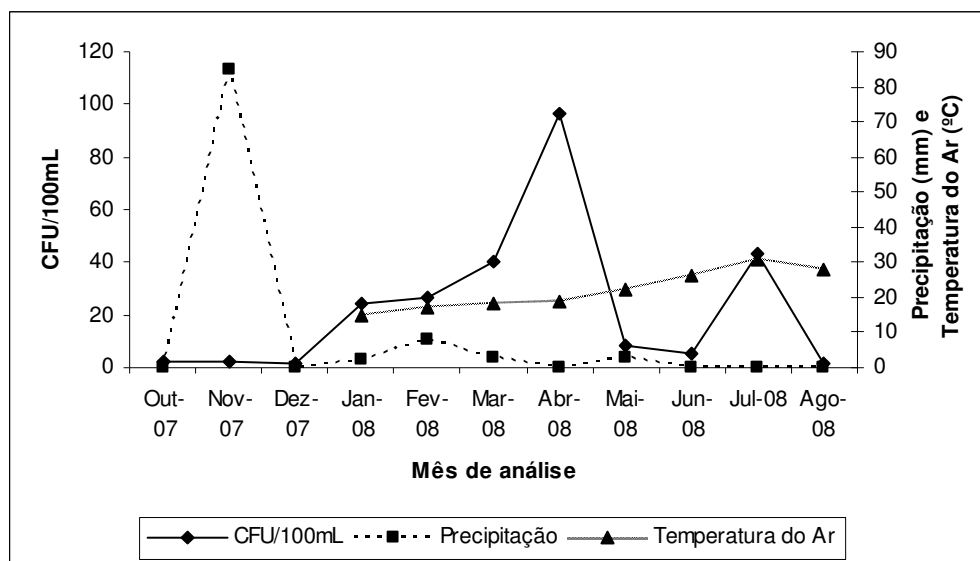


Figura A13.3 – Comparação dos valores de ocorrência de fungos ao longo do tempo (CFU/100mL) das amostras de água subterrânea com os valores de precipitação (mm) e de temperatura do ar (°C) registados nos dias de colheita das amostras em cada mês de análise.

ANEXO A14 – COMPARAÇÃO DOS DADOS DE OCORRÊNCIA DE FUNGOS E DE BACTÉRIAS

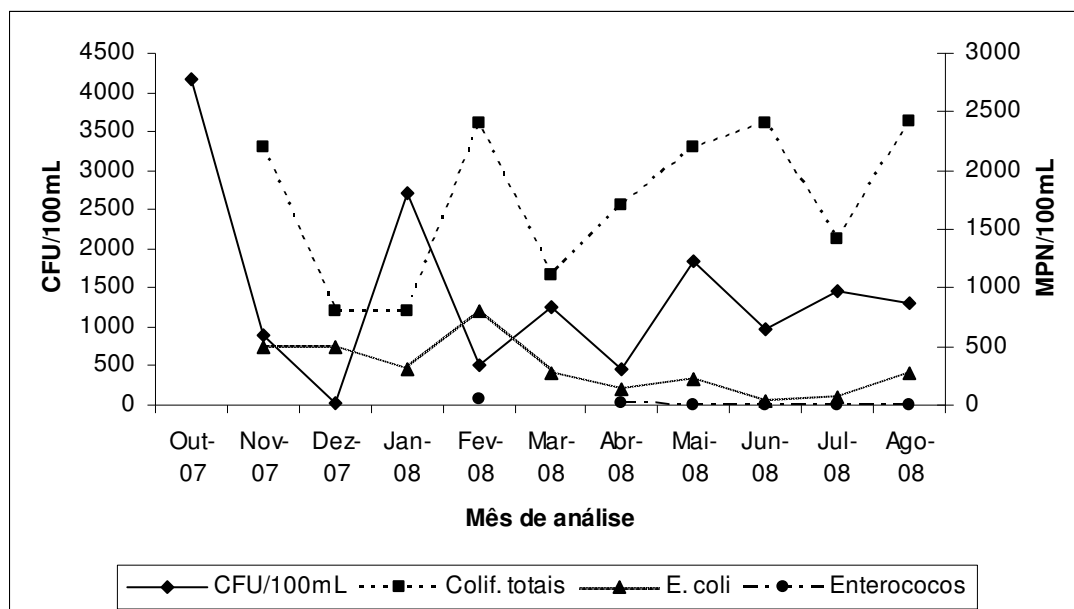


Figura A14.1 – Comparação dos valores de ocorrência de fungos (CFU/100mL) e de bactérias (MPN/100mL) ao longo do tempo para as amostras de água superficial.

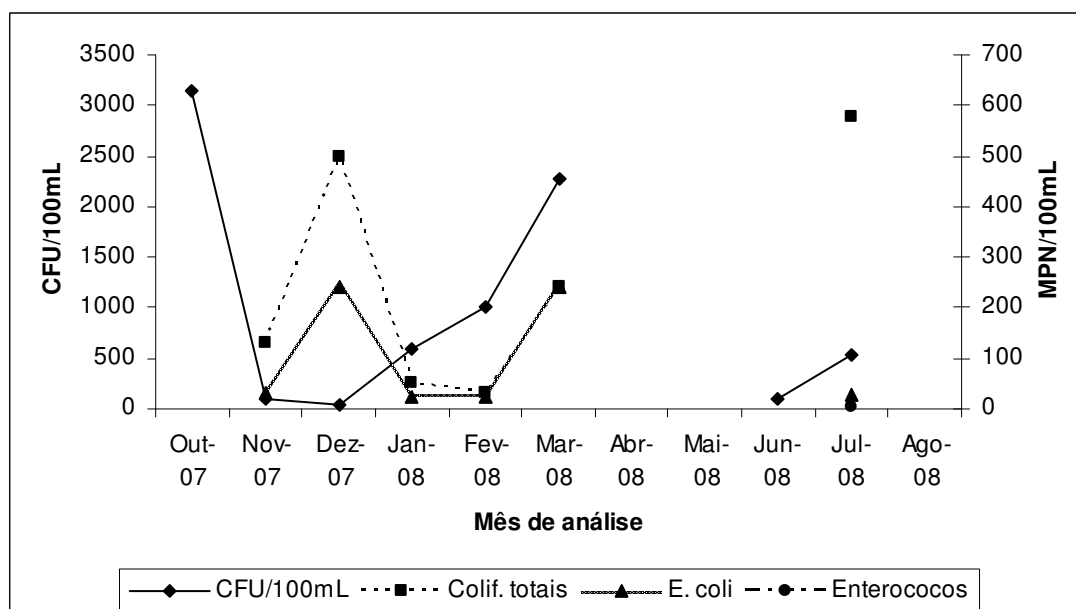


Figura A14.2 – Comparação dos valores de ocorrência de fungos (CFU/100mL) e de bactérias (MPN/100mL) ao longo do tempo para as amostras de água de nascente.

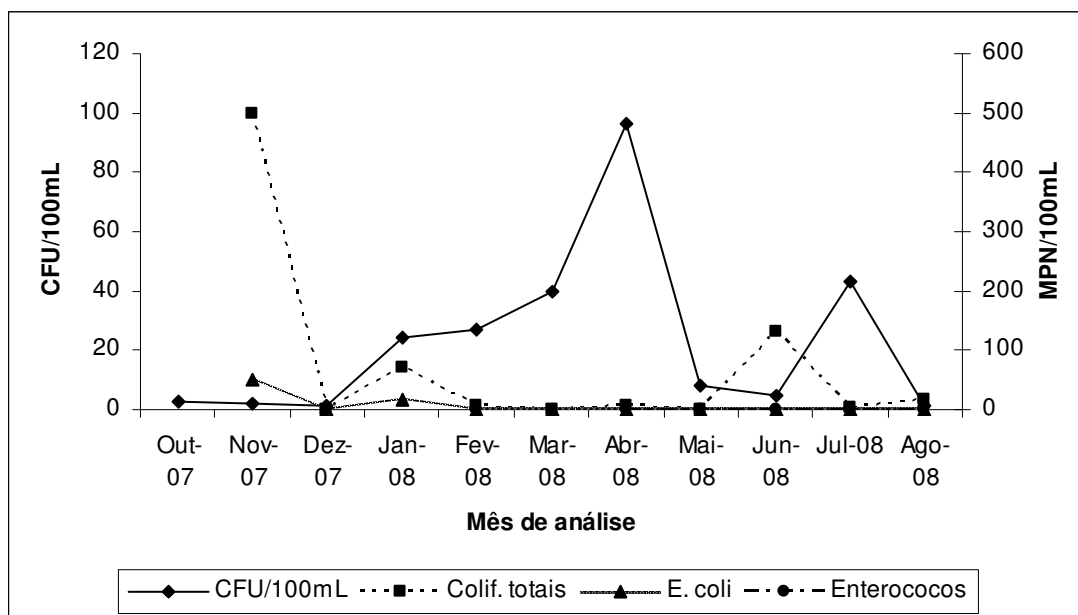


Figura A14.1 – Comparação dos valores de ocorrência de fungos (CFU/100mL) e de bactérias (MPN/100mL) ao longo do tempo para as amostras de água subterrânea.

ANEXO A15 – FUNGOS IDENTIFICADOS

Classificação taxonómica dos géneros de fungos filamentosos identificados:

***Acremonium* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Subphylum: Ascomycotina
Order: Hypocreales
Family: Hypocreaceae
Genus: *Acremonium*

***Alternaria* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycot
Class: Euascomycetes
Order: Pleosporales
Family: Pleosporaceae
Genus: *Alternaria*

***Aspergillus* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Order: Eurotiales
Family: Trichocomaceae
Genus: *Aspergillus*

***Beauveria* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Class: Euascomycetes
Order: Clavicipitales
Genus: *Beauveria*

***Cladosporium* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Subphylum: Ascomycotina
Genus: *Cladosporium*

***Fusarium* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Order: Hypocreales
Family: Hypocreaceae
Genus: *Fusarium*

***Penicillium* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Class: Euascomycetes
Order: Eurotiales
Family: Trichomaceae
Genus: *Penicillium*

***Scopulariopsis* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Class: Euascomycetes
Order: Microascales
Family: Microascaceae
Genus: *Scopulariopsis*

***Stachybotrys* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Class: Sordariomycetes
Order: Hypocreales
Family: Dematiaceae
Genus: *Stachybotry*

***Trichoderma* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Class: Euascomycetes
Order: Hypocreales
Family: Hypocreaceae
Genus: *Trichoderma*

Classificação taxonómica dos géneros das leveduras identificadas:

***Candida* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Subphylum: Ascomycotina
Class: Ascomycetes
Order: Saccharomycetales
Family: Saccharomycetaceae
Genus: *Candida*

***Cryptococcus* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Basidiomycota
Subphylum: Basidiomycotina
Order: Sporidiales
Family: Sporidiobolaceae
Genus: *Filobasidiella*

(*Cryptococcus*)

***Kloeckera* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Class: Hemiascomycetes
Order: Endomycetales
Family: Saccharomycetaceae
Genus: *Kloeckera*

***Rhodotorula* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Basidiomycota
Class: Urediniomycetes
Order: Sporidiales
Family: Sporidiobolaceae
Genus: *Rhodotorula*

***Saccharomyces* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Class: Hemiascomycetes
Order: Saccharomycetales
Family: Saccharomycetaceae
Genus: *Saccharomycetaceae*

***Zygosaccharomyces* spp.**

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Subphylum: Saccharomycotina
Class: Saccharomycetes
Order: Saccharomycetales
Family: Saccharomycetaceae
Genus: *Zygosaccharomyces*

Características macroscópicas e microscópicas dos fungos filamentosos identificados:



Acremonium sp.

Cor da colónia – branca
Cor do verso – creme
Diâmetro (7 dias) – 52,5 mm
Morfologia das colónias – forma rizoide, margens filamentosas, plana

MACROSCOPIA



Conidióforos – normalmente ramificados
Fiálides – crescem do micélio aéreo, 20-45 µm comprimento
Conídios – pequenas cabeças, assimétricos, elipsoidais ou globosos, 3.5-5.8 x 1.5-2.5 µm
Clamidósporos por vezes presente

MICROSCOPIA



Alternaria cf. alternata

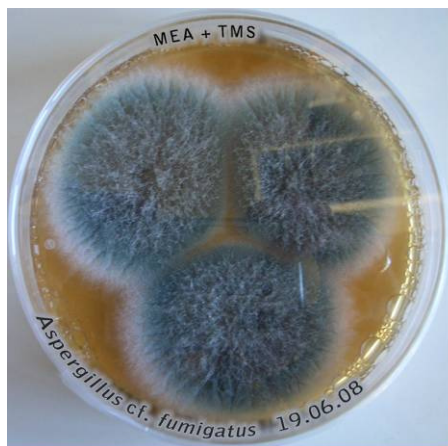
Cor da colónia – verde esbranquiçada
Cor do verso – creme, castanha no centro
Diâmetro (7 dias) – 46,0 mm
Morfologia das colónias – forma circular, margens filamentosas, elevação convexa, superfície felpuda

MACROSCOPIA



Conidióforos – curtos, paredes lisas, simples mas por vezes ramificados em 1 ou mais sítios, 40-70 x 3-4 µm
Conidióforos secundários – curtos, início das cadeias de conídios, 2-3 x 3-4 µm
Conídios – ovóides ou elipsoidais, até 8 septos transversais e vários longitudinais, 25-40 x 5-12 µm

MICROSCOPIA



Aspergillus cf. fumigatus

Cor da colónia – azul com uma halo branco
Cor do verso – creme
Diâmetro (7 dias) – 49,6 mm
Morfologia das colónias – forma circular, margens filamentosas, plana

MACROSCOPIA



Conidióforos – curtos, paredes lisas
Vesículas – 20-30 μm diâmetro
Fiálides – 6-8 x 2-3 μm
Conídios – globosos ou subglobosos, paredes rugosas, 2.5-3.0 μm

MICROSCOPIA



Aspergillus cf. niger

Cor da colónia – branca, coberta com esporos negros
Cor do verso – creme
Diâmetro (7 dias) – 45,6 mm
Morfologia das colónias – forma circular, margens filamentosas, elevadas

MACROSCOPIA



Conidióforos – paredes lisas
Vesículas – 50-100 μm diâmetro
Fiálides – 7.0-9.5 x 3-4 μm
Metula – 15-25 x 4.5-6.0 μm
Conídios – globosos ou subglobosos, com verrugas irregulares, espinhos ou sulcos, 3.5-5.0 μm

MICROSCOPIA



Aspergillus cf. ustus

Cor da colônia – castanha com um halo branco
 Cor do verso – creme
 Diâmetro (7 dias) – 25,8 mm
 Morfologia das colônias – forma circular, margens inteiras, elevação protuberante, superfície felpuda

MACROSCOPIA



Cabeças – 100-125 μm diâmetro
 Conidióforos – até 400 μm comprimento, 3.0-6.0 μm largura
 Vesículas – 7-15 μm diâmetro
 Fiálides – 4-7 x 3-4 μm
 Metula – 5-7 x 2.5-3.0 μm
 Conídios – globosos, rugosos, 3.0-4.5 μm
 Presença de células de Hülle

MICROSCOPIA



cf. Beauveria sp.

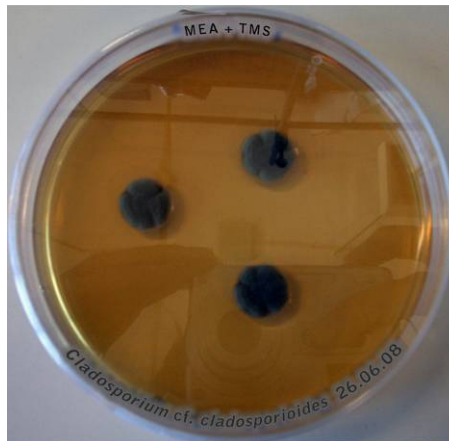
Cor da colônia – branca
 Cor do verso – creme
 Diâmetro (7 dias) – 15,3 mm
 Morfologia das colônias – forma circular, margens filamentosas, elevação convexa

MACROSCOPIA



Conídios – unicelulares, globosos ou ovais, 2-4 μm diâmetro
 Células conidiogénicas tendem a formar aglomerados densos (assemelham-se a pequenas bolas de pó)
 Ascomata – globosos ou ovóides, 150-220 μm diâmetro, apêndices de hifas
 Ascósporos – com 8 esporos
 Ascósporos – forma de limão, 9-11 x 7-8.5 μm

MICROSCOPIA



Cladosporium cf. cladosporioides

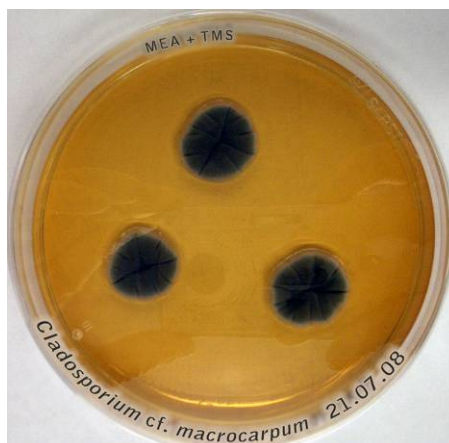
Cor da colónia – verde escuro
Cor do verso – negro
Diâmetro (7 dias) – 12,6 mm
Morfologia das colónias – forma circular, margens inteiras, elevação protuberante

MACROSCOPIA



Conidióforos – até 350 µm de comprimento, 2-6 µm largura, sem nódulos de elongação
Ramoconídios – na base da cadeia, 1-2 septos, 30 x 3-5 µm
Conídios – principalmente unicelulares, elipsoidais ou com forma de limão, 3-7 x 2-4 µm, paredes normalmente lisas

MICROSCOPIA



Cladosporium cf. macrocarpum

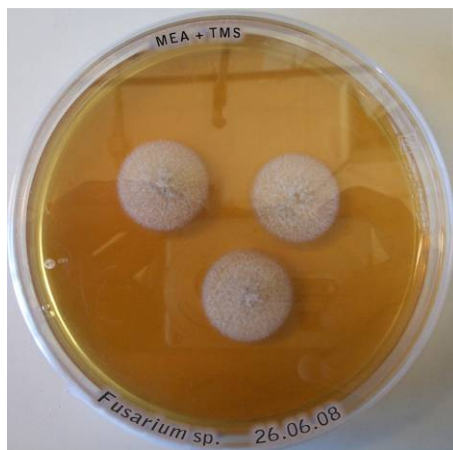
Cor da colónia – verde escuro
Cor do verso – negro
Diâmetro (7 dias) – 14,8 mm
Morfologia das colónias – forma irregular, margens inteiras, elevação protuberante

MACROSCOPIA



Conidióforos – até 300 µm de comprimento, 4-8 µm largura, nódulos de elongação com 9-11 µm diâmetro
Conídios – 0-3 septos, principalmente unicelulares com 7-17 x 5-8 µm

MICROSCOPIA

*Fusarium sp.*

Cor da colónia – creme amarelado

Cor do verso – creme

Diâmetro (7 dias) – 20.0 mm

Morfologia das colónias – forma circular, margens filamentosas, elevação convexa, superfície felpuda



Macroconídios – 7.7 µm de comprimento

Microconídios – não observados

MACROSCOPIA

MICROSCOPIA

*Penicillium cf. chrysogenum*

Cor da colónia – verde, gotas de exsudado amarelo

Cor do verso – creme

Diâmetro (7 dias) – 16.6 mm

Morfologia das colónias – forma irregular, margens onduladas, elevação protuberante



Conidióforos – normalmente ter- a quaterverticilados mas ocasionalmente bi- a terverticilados
Estipe – paredes lisas, 250-500 x 25-3.5 µm
Metulas – com 3-6 fiálides, 8-15 x 2.0-2.3 µm
Fiálides – forma de garrafa, 7-10 x 2.0-2.5 µm
Conídios – subglobosos ou elipsoidais, paredes lisas, 3.0-4.0 x 2.8-3.8 µm

MACROSCOPIA

MICROSCOPIA



Penicillium cf. oxalicum

Cor da colônia – azul esverdeado

Cor do verso – creme escuro

Diâmetro (7 dias) – 38.7 mm

Morfologia das colônias – forma circular, margens filamentosas, plana, superfície aveludada

MACROSCÓPIA



Conidióforos – normalmente biverticilados, paredes lisas

Metulas – normalmente 2-4, 15-25 µm de comprimento

Fiálides – cilíndricas a lanceoladas de extremidade estreita, 10-15 µm de comprimento

Conídios – elipsoidais, paredes lisas, 3.5-5.0 µm

MICROSCÓPIA



cf. Scopulariopsis sp.

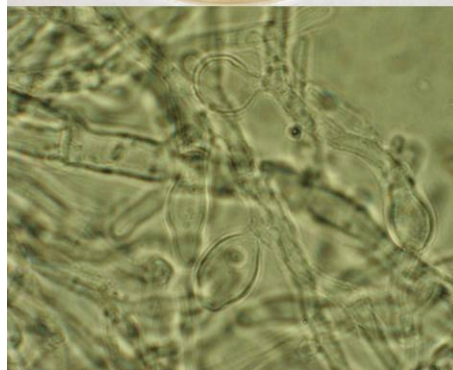
Cor da colônia – amarelo claro

Cor do verso – amarelo

Diâmetro (7 dias) – 32.6 mm

Morfologia das colônias – forma irregular, margens filamentosas, elevadas, micélio felpudo

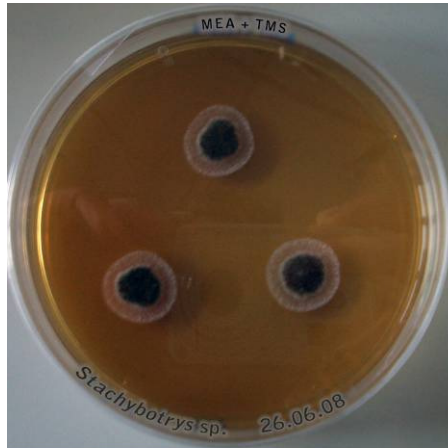
MACROSCÓPIA



Células conidiogénicas aneladas, isoladas ou em grupos de 2-10, 2-27µm de comprimento

Conídios – globosos ou em ovais largas, base truncada, 5-8 x 5-7 µm, paredes lisas

MICROSCÓPIA



Stachybotrys sp.

Cor da colónia – castanho escuro ao centro, branco à volta

Cor do verso – castanho escuro ao centro, branco à volta

Diâmetro (7 dias) – 14.8 mm

Morfologia das colónias – forma circular, margens onduladas, elevadas

MACROSCOPIA

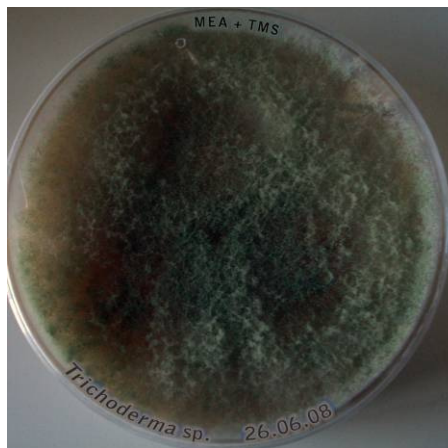


Conidióforo – simples ou ramificado.

Fiálides – ovóides, parede lisa, mais escuras no ápice, 12-14 x 5-7 μm .

Conídios – ovóides a elipsoidais, 10-13 x 5-7 μm , castanhos escuros ou negros, superfície rugosa

MICROSCOPIA



Trichoderma sp.

Cor da colónia – verde

Cor do verso – creme

Colónia invasiva, muito filamentosa

MACROSCOPIA



Conidióforos – em ramagem, muito ramificados, formam aglomerados de fiálides em forma de garrafa

Clamidósporos – presentes na maioria das espécies, intercalados ou terminais, globosos ou elipsoidais, paredes lisas

MICROSCOPIA